



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANIEL MOREIRA NERIS

AVALIAÇÃO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum*
ssp.) COM BAIXA PRODUÇÃO DE ETILENO

CAMPINAS

2021

DANIEL MOREIRA NERIS

**AVALIAÇÃO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* ssp.)
COM BAIXA PRODUÇÃO DE ETILENO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na Área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: *MARCELO MENOSSI TEIXEIRA*
Co-orientador: *LUCIA MATTIELLO*

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO DANIEL MOREIRA NERIS, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO TEIXEIRA MENOSSI.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

N356a Neris, Daniel Moreira, 1996-
Avaliação de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) com baixa produção de etileno / Daniel Moreira Neris. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Marcelo Menossi Teixeira.

Coorientador: Lucia Mattiello.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Etileno. 3. RNA interferente pequeno. 4. ACC sintase. I. Menossi, Marcelo, 1968-. II. Mattiello, Lucia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of sugarcane plants (*Saccharum* spp.) with low ethylene production

Palavras-chave em inglês:

Sugarcane

Ethylene

RNA, Small Interfering

1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Menossi Teixeira [Orientador]

Monalisa Sampaio Carneiro

Helaine Carrer

Data de defesa: 13-01-2021

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0988-0564>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3537211174939199>

Campinas, 13 de janeiro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Dra. Monalisa Sampaio Carneiro

Dra. Helaine Carrer

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação da Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

AGRADECIMENTOS

Eu sou imensamente grato:

À minha mãe Luciana e irmã Regiane, pelo suporte, acreditar e respeitar minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Menossi e Dra. Lucia pela orientação, confiança e principalmente paciência durante o mestrado.

Aos meus amigos (em ordem alfabética) Bruno Fernando, Érica da Silva, Isabella Rodrigues, Nathália Fagundes e Thiago Roncini pelo companheirismo e ajuda no alívio do estresse.

Aos meus companheiros do LGF (em ordem alfabética), Adriana, Ana, Camila, José, Maria, Mark, Nery, Nicolas, Pedro, Rafael, William e Wilson pela ajuda no dia-a-dia e troca de experiências.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto (USP, São Paulo, Brasil) e sua equipe no auxílio nas medições de etileno por cromatografia gasosa.

Ao Prof. Dr. Gustavo Zúñiga (Universidade de Santiago do Chile, Santiago, Chile) e sua equipe pelas análises dos compostos antioxidantes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto temático 2013/15576-5 e do post-doc 2015/23789-4, os quais meu trabalho está relacionado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Avaliação de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.) com baixa produção de etileno

Cana-de-açúcar é a principal cultura usada para a produção de etanol e sacarose. É híbrido de *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum*, e apresenta alta concentração de sacarose nos colmos e resistência a intempéries ambientais. Apesar de sua grande importância, cana-de-açúcar ainda possui muitas lacunas que permeiam sua fisiologia e genética, em especial os processos envolvendo hormônios vegetais. Em plantas modelos, os estudos de vias hormonais foram feitos, inicialmente, usando mutantes de componentes específicos de suas vias. Usando essa estratégia, pode-se entender de forma direta a função de hormônios e de componentes de suas vias. Já em cana-de-açúcar, seu genoma altamente poliploide e aneuploide, torna os estudos de mutantes inviável, o que direcionou ao uso diferentes abordagens para o estudo envolvendo hormônios vegetais. Atualmente, sabe-se que o fitohormônio etileno apresenta crucial importância para o processo de maturação e crescimento da cana-de-açúcar, no entanto, seus mecanismos moleculares ainda são obscuros. A principal forma de estudar a ação do etileno tem sido através da aplicação de Ethephon, um composto liberador de etileno. Porém, para estudos de desenvolvimento, essa abordagem apresenta desvantagens, uma vez que os resultados são frutos de respostas pontuais ao hormônio, o que pode não representar a resposta ao longo do ciclo vegetativo. Com o objetivo de estudar a influência do etileno ao longo do desenvolvimento da cana-de-açúcar, usamos a técnica de RNA de interferência (RNAi) para silenciar enzimas chaves para a produção de etileno (ÁCIDO 1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXÍLICO SINTASE (ACS)), dessa forma reduzindo a produção endógena desse hormônio. Foi avaliado mudanças no desenvolvimento das plantas, conteúdo de sacarose, fotossíntese, aparato antioxidante não enzimático e expressão de genes ligados ao crescimento e resposta ao etileno. Foi possível observar que a baixa produção de etileno pode induzir o crescimento da cana-de-açúcar, reduzir a fotossíntese sem alterar os níveis finais de sacarose no colmo, induz a produção de substâncias com capacidades antioxidantes nas folhas. Adicionalmente, os dados de expressão gênica mostraram que a baixa produção de etileno pode induzir a expressão de diversos fatores de transcrição envolvidos com o crescimento da planta e resposta primária do etileno. Contraditoriamente, foi observado que uma proteína DELLA, repressora do crescimento, teve sua expressão aumentada. Os resultados aqui mostrados e discutidos são apenas o início do entendimento mais profundo da ação do etileno em cana-de-açúcar, e podem fornecer base para estudos futuros.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; etileno; RNAi, ACS; desenvolvimento.

ABSTRACT

Evaluation of sugarcane plants (*Saccharum* ssp.) with low ethylene production

Sugarcane is the main crop used for production of ethanol and sucrose. It is a hybrid of *Saccharum officinarum* and *S. spontaneum*, with high concentration of sucrose in the stems and resistance to environmental stress. Despite of its great importance, sugarcane still has many gaps involving its physiology and genetics, especially the processes involving plant hormones. In model plants, studies of hormonal pathways were initially carried out using mutants of specific components of their pathways. Using this strategy is possible to directly understand the function of hormones and their pathway components. In sugarcane, on the other hand, its highly polyploid and aneuploid genome makes studies of mutants unfeasible, which led to the use of different approaches for plant hormones studies. Currently, it is known that ethylene phytohormone has crucial importance for the maturation and growth process of sugarcane, however, its molecular mechanisms are still obscure. The main way to study the action of ethylene has been through the application of Ethepon, an ethylene releasing compound. However, for development studies, this approach has disadvantages, since the results are consequence of a unique point of hormone exposition, which may not represent the response throughout the vegetative cycle. In order to study the influence of ethylene throughout the development of sugarcane, we used the inference RNA (RNAi) technique for silencing key enzymes of ethylene biosynthesis pathway (AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID SYNTHASE (ACS)), thereby, reducing the endogenous production of this hormone. Were evaluated changes in plant development, sucrose content, photosynthesis, non-enzymatic antioxidant apparatus and expression of genes linked to growth and response to ethylene. It was possible to observe that the low production of ethylene can induce the growth of sugarcane, reduce photosynthesis without altering the final levels of sucrose in the stem, and induces the production of substances with antioxidant capacities in the leaves. Additionally, gene expression data showed that low ethylene production can induce the expression of several transcription factors involved in ethylene growth and primary response. Contradictory, it was observed that a growth-repressing protein DELLA had its expression increased. The results shown and discussed here are just the beginning of a deeper understanding of the action of ethylene on sugarcane, and may provide foundation to future studies.

Keywords: Sugarcane; ethylene; RNAi, ACS; development

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vetor pGVG_hpACS123 usado para produção das plantas transgênicas. A expressão do transcrito é controlada pelo promotor *ZmUbi1* (com éxon não traduzível e um íntron na extremidade 5') e pela região 3' não traduzida CaMV 35S. Uma FLAG-tag está posicionada *upstream* à região 3' não traduzida. O marcador de seleção vegetal é o gene *NPTII*, controlado pelo promotor CaMV 35S. Cmr: gene de resistência cloranfenicol. *ccdB*: gene letal. RB: borda direita do vetor. LB: borda esquerda do vetor. O *backbone* do vetor pGVG é uma versão modificada do pCAMBIA2300 (CAMBIA, Canberra, Austrália) (Guidelli et al., 2018). No vetor final o *hairpin* foi inserido no lugar do Cmr e *ccdB*, via recombinação com as regiões *attR1* e *attR2*..... 32

Figura 2: Alinhamento das sequências proteicas dos ScACSs e AtACSs. Estão indicados na figura: sete regiões conservadas na família das ACSs (caixas); Resíduos E e Y responsáveis pela especificidade enzimática e PSN relacionado com atividade enzimática (cinza); Resíduos de S alvos de fosforilação (vermelho); *Motif* RLSF/RLSL que interage com a CDPK (verde) nas ACS do tipo 1; Domínio TOE necessário para fosforilação pela CDPK e interação com ETO1 nas ACS o tipo 2 (azul); Região rica em região rica em D/R/E necessária para interação com a ETO1 (preto). As barras abaixo indicam o grau de conservação. 37

Figura 3: Árvore filogenética comparando ACS de Arabidopsis e cana-de-açúcar. As ACS foram agrupadas em três grupos baseados na regulação pós-transcricional: tipo 1, tipo 2 e tipo 3. Os valores de *bootstrap* estão sendo representado nas ramificações a árvore. 38

Figura 4: Expressão gênica dos *ScACSs* e produção de etileno *in vitro*. A expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$; barras) e produção de etileno (linha pontilhada) foram comparadas com as plantas transformadas com o vetor pGVG vazio (EV). Eventos marcados com * apresentaram produção de etileno estatisticamente diferente pelo teste t ($p \leq 0,05$; $n = 3$). 40

Figura 5: Produção de etileno e expressão das *ScACSs* nas plantas R0 com 7 meses. Eventos marcados com * apresentaram produção de etileno estatisticamente menor pelo teste t (a) ($p \leq 0,05$); expressão gênica dos *ScACS* (*Fold change*, $2^{-\Delta\Delta CT}$) nas folhas dos 5 eventos com menor produção desse hormônio (b); as barras indicam o desvio padrão das médias ($n=3$). 41

Figura 6: Expressão dos *ScACSs* e produção de etileno foliar nas plantas S1. Expressão gênica (*Fold change*, $2^{-\Delta\Delta CT}$) das folhas (a) de plantas com 3 meses e colmo de plantas com 6 meses (b); As barras indicam o desvio padrão das médias ($n=3$). 41

Figura 7: Perfil de expressão dos genes avaliados nas folhas das plantas S1 com 3 meses. Expressão gênica (*Fold change*, $2^{-\Delta\Delta CT}$) dos genes *ScACO5*, *ScEIL1*, *ScERF1*, *ScPIF3*, *ScPIF4*,

<i>ScPIF5</i> e <i>ScGAI</i> nas folhas +1 das plantas com produção reduzida de etileno; as barras indicam o desvio padrão das médias (n=3).	43
Figura 8: Perfil de expressão dos genes avaliados nos colmos das plantas S1 com 6 meses. Expressão gênica (<i>Fold change</i> , $2^{-\Delta\Delta CT}$) dos genes <i>ScACO5</i> , <i>ScEIL1</i> , <i>ScERF1</i> , <i>ScPIF3</i> , <i>ScPIF4</i> , <i>ScPIF5</i> e <i>ScGAI</i> em colmos maduros das plantas com produção reduzida de etileno; as barras indicam o desvio padrão das médias (n=3).	44
Figura 9: Conteúdo de clorofila (a), assimilação de CO ₂ (b), condutância estomática (c) e transpiração (d) das folhas das plantas com baixa produção de etileno S1 com 6 meses. Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t comprando com o WT ($p \leq 0,05$; n = 5).....	49
Figura 10: Taxa de germinação das gemas laterais das plantas S1 com 8 meses.....	50
Figura 11: Análise do potencial antioxidante não-enzimático do extrato foliar de plantas S1 com 3 meses. Taxa de captura de radicais livres (%DPPH), poder redutor dos íons ferro (FRAP) representado pelo equivalente de ácido ascórbico (EAA) e conteúdo de fenóis. Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t ($p \leq 0,05$; n = 3).	53
Figura 12: Principais respostas provocadas pela baixa produção de etileno no presente estudo.	56
Figura suplementar 1: Sequências das <i>ScACSs</i> usadas no estudo. As regiões em sublinhadas foram sugeridas pelo <i>software</i> Galaxy (Mareuil, Doppelt-azeroual e Ménager, 2017) para serem usadas como alvo pelo RNAi que construímos.	69
Figura suplementar 2: Expressão gênica do FT <i>ScEIL3</i> em folha (A) e colmo (B) nas plantas S1 com 3 e 6 meses respectivamente. (n = 3).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de crescimento das plantas S1 com três meses. Altura das plantas (AP), número de perfilhos (NP), comprimento das folhas (CF), largura das folhas (LF), área foliar (AF). Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t comprando com o WT ($p \leq 0,05$; $n=5$)..... 47

Tabela 2: Brix° de três pontos do colmo de plantas S1 com 6 meses. O Brix° pode ser interpretado como sendo a porcentagem de sacarose no caldo coletado. IM (índice de maturação) mostra o estágio de maturação em que as plantas se encontram: menor que 0,60 = verde, entre 0,60 e 0,85 = em maturação, entre 0,85 e 1 = madura e maior que 1 = consumo da sacarose. Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t comprando com o WT. ($p \leq 0,05$; $n=5$)..... 51

Tabela suplementar 1: Lista de genes e primers usados para qPCR. Os primers para as três ACSs foram desenhados por Dr. Lucia Mattiello em seu pos-doc, (FAPESP 2015/23789-4), o primers para a *ScGAI* desenhados por Tavares *et al.*, (2018), os primer marcados com * foram obtidos em Cunha *et al.* (2017) e o marcados com ** foram desenhados usando Primer-BLAST, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>..... 66

Tabela suplementar 2: Parâmetros biométricos das plantas R0 com 7 meses. Altura das plantas (AP), diâmetro do colmo (DC), número de nós (NN), número de perfilhos (NP), número de folhas (NF), comprimento das folhas (CF), largura das folhas (LF) e área foliar (AF). Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t ($p \leq 0,05$; $n=3$).
..... 67

Tabela suplementar 3: Parâmetros biométricos das plantas R0 com 12 meses. Altura das plantas (AP), diâmetro do colmo (DC), número de nós (NN), número de perfilhos (NP), número de folhas (NF), comprimento das folhas (CF), largura das folhas (LF) e área foliar (AF). Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t ($p \leq 0,05$; $n=3$).
..... 67

Tabela suplementar 4: Parâmetros biométricos das plantas S1 com 6 meses. Altura das plantas (AP), diâmetro do colmo (DC), número de nós (NN), número de perfilhos (NP), número de folhas (NF), comprimento das folhas (CF), largura das folhas (LF) e área foliar (AF). Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t ($p \leq 0,05$; $n=3$).
..... 68

SUMÁRIO

1	Introdução ao trabalho	13
1.1	Cultura da cana-de-açúcar.....	13
1.2	Estudos sobre etileno em cana-de-açúcar	14
1.3	Biossíntese do etileno	15
1.4	Estudos da via do etileno usando mutantes.....	15
1.5	Influência do <i>crostalk</i> entre etileno e giberelina no desenvolvimento vegetal.	17
1.6	Referências.....	19
2	DESSENDANDO O PAPEL DE ETILENO EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	28
2.1	Introdução	29
2.2	Materiais e métodos	32
2.2.1	Identificação e classificação do gene <i>ScACS3</i>	32
2.2.2	Transformação das plantas	32
2.2.3	Quantificação de etileno	33
2.2.4	Extração de RNA e síntese de cDNA	33
2.2.5	Expressão gênica usando qPCR	34
2.2.6	Avaliação biométrica.....	34
2.2.7	Quantificação de clorofila	34
2.2.8	Avaliação da Fotossíntese	35
2.2.9	Teste de Germinação	35
2.2.10	Atividade antioxidante não enzimática.....	35
2.3	Resultados e discussão	35
2.3.1	Alinhamento e filogenia das ACS	35
2.3.2	Produção de etileno e expressão das <i>ScACSs</i>	39
2.3.3	Influência da baixa produção de etileno na expressão do gene <i>ScACO5</i>	42
2.3.4	Fatores de transcrição de resposta primária ao etileno têm a expressão induzida pela baixa produção desse hormônio.....	44

2.3.5	Expressão dos <i>ScPIFs</i> é induzida pela baixa produção de etileno	46
2.3.6	Expressão do gene <i>ScGAI</i> foi induzida sem inibir o crescimento	47
2.3.7	Influência do silenciamento dos ACSs no crescimento das plantas.....	48
2.3.8	A baixa produção de etileno pode reduzir a assimilação de CO ₂	48
2.3.9	Baixa produção de etileno reduz a velocidade da germinação de gemas laterais 49	
2.3.10	Conteúdo de sacarose	50
2.3.11	O aparato antioxidante não-enzimático é induzido pela redução nos níveis de etileno 51	
2.4	Considerações finais	54
3	Conclusões Gerais	55
4	Referências	57
5	APÊNDICES	66
6	ANEXOS	71
6.1	Declaração que a tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora	71
6.2	Termo de aprovação de pesquisa pela comissão de Bioética e/ou Biossegurança. ...	72

1 INTRODUÇÃO AO TRABALHO

O hormônio etileno apresenta possui grande influência no crescimento vegetal, participando de processos como crescimento, maturação e senescência. Os estudos desse hormônio são na grande maioria desenvolvidos usando mutantes de plantas modelos, como *Arabidopsis*, onde seus mecanismos de ação são bem elucidados. No entanto, o papel do etileno em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), que possui grande importância para o agronegócio brasileiro, ainda não foi profundamente estudado. Os principais estudos da ação do etileno em cana-de-açúcar são feitos usando de compostos liberadores de etileno, que também é frequentemente usado no manejo dessa cultura e possui grande impacto sobre a sua produtividade. Devido ao alto índice de poliploidia e aneuploidia do genoma da cana-de-açúcar, a produção de mutantes como em *Arabidopsis* é inviável. Aqui nos propomos a estudar os efeitos da baixa produção de etileno em cana-de-açúcar, através do silenciando por RNAi de genes que codificam as 3 ÁCIDOS 1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXÍLICO SINTASE (ACS), enzimas chaves na biossíntese desse hormônio. A partir dessas plantas transgênicas nós identificamos mudanças no crescimento, fisiologia e expressão de genes importantes para a resposta ao etileno e crescimento.

1.1 Cultura da cana-de-açúcar

Cana de açúcar faz parte da família Poaceae, e é produto do cruzamento entre duas espécies, *Saccharum officinarum* (com alto conteúdo de sacarose nos colmos) e *S. spontaneum* (alto vigor e potencial de adaptação e resistência a doenças) (Sreenivasan, Ahloowalia e Heinz, 1987). A cana-de-açúcar moderna também apresenta genoma com altamente poliploide e aneuploide, podendo ter por volta de 100-130 cromossomos, dos quais, apenas 10-20 são provenientes da *S. spontaneum* (D'Hont *et al.*, 1996; Piperidis, Piperidis e D'Hont, 2010). Como consequência desse cruzamento, essas plantas apresentam alta produtividade e resiliência a diversos tipos de estresses. Atualmente, essa cultura é cultivada em 106 países (FAOSTAT, 2018), em uma área estimada em 28 milhões de hectares, sendo a principal fonte para produção de açúcar, e responsável por 85% da produção mundial desse produto (OECD/FAO, 2018). Além disso, tem sido usada como uma das principais culturas na produção de biocombustíveis, devido seu alto potencial na produção de etanol e ser uma fonte renovável de energia, contribuindo para a redução da emissão de gases do efeito estufa (Waclawovsky *et al.*, 2010). A cana-de-açúcar também desempenha grande importância para a economia brasileira, uma vez que, o Brasil é responsável por aproximadamente 40% da produção mundial de açúcar (Ferraro, Rivero e Ghersa, 2009). Tal impacto, é resultado dos 8,382 mil hectares usados para o cultivo

e produção de cana-de-açúcar, e da produtividade de estimada em 615,978 mil toneladas (Conab, 2019).

Dentre as diferentes variedades de cana-de-açúcar pode-se encontrar ciclos de vida variando 10 a 22 meses, porém, sempre apresentando 4 estágios fenológicos: (1) fase de brotação e emergência, onde as gemas usadas para a propagação geminam e ocorre o crescimento de raízes temporárias; (2) fase de início do perfilhamento e estabelecimento das plantas: estabelecimento do perfilho principal, desenvolvimento do sistema radicular permanente e o açúcar produzido nas folhas é investido no crescimento; (3) fase de intenso perfilhamento: ocorre o desenvolvimento dos perfilhos secundários; (4) fase de maturação: o perfilhos atingem o ápice do crescimento e acúmulo de sacarose nos colmos (Segato, Mattiuz e Mozambani, 2006). No fim do ciclo vegetativo, quando atingem a maturação, as plantas são colhidas e enviadas para usinas de açúcar e álcool, onde o caldo é extraído e pode ser usado para a produção de açúcar ou etanol de primeira geração (1G) a partir da fermentação da sacarose. O bagaço e as folhas podem ser usadas para gerar energia através da queima, produção de etanol de segunda geração (2G) (Dias *et al.*, 2011), e mais recentemente para produção e bioplásticos (Tsiropoulos *et al.*, 2015).

1.2 Estudos sobre etileno em cana-de-açúcar

A maturação, é o processo e maior interesse em cana-de-açúcar, baseia-se no acúmulo de açúcar, produto da fotossíntese nas folhas, nas células parenquimáticas do colmo, da base para o ápice (McCormick, Cramer e Watt, 2006). Nesse processo a concentração de açúcar nos colmos pode atingir 700 mM e representar 27% de toda a massa fresca (Bull e Glasziout, 1963; Moore, 1995; Welbaum e Meinzer, 1990). Durante a síntese e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar, o balanço entre algumas enzimas chaves determinam a eficiência do processo: enquanto que a sacarose sintase (SuSy) (atividade bidirecional) e a sacarose fosfato sintase (SPS) (reação direcional) estão envolvidas na biossíntese, a hidrólise da sacarose é catalisada pela invertase ácida (AI) e invertase neutra (NI).

Como parte do manejo, a aplicação de análogos de etileno é frequentemente usado para inibir o crescimento meristemático da cana-de-açúcar, o que conseqüentemente induz o processo de maturação aumentando o conteúdo de sacarose nos colmos (Silva e Caputo, 2012). Cunha *et al.* (2017) observaram que a aplicação de Ethephon, maturador que libera etileno nas células, aumentou a atividade das enzimas SuSy e NI, mas reduziu a atividade da SPS e IA, o que foi acompanhado do aumento do acúmulo de sacarose nos colmos. Já Chong *et al.* (2010), observaram que a expressão das invertases do vacúolo e da parede celular foram aumentadas

junto com os níveis de sacarose em plantas de cana-de-açúcar tratadas com ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA), um composto formador de etileno. O tratamento de gêmeas laterais usadas para a propagação da cana-de-açúcar com Ethephon pode induzir o aumento da taxa de germinação, redução do tempo de germinação, aumento do conteúdo de clorofila, prolina e fenóis total, além de aumentar a estatura das plantas (Jain *et al.*, 2018). Adicionalmente, Wu *et al.* (2004) e Roberto *et al.* (2015) e encontraram que a responsividade ao Ethephon em cana-de-açúcar é genótipo-dependente. Em ambos os trabalhos, os genótipos responsivos tratados com Ethephon também tiveram mitigação dos efeitos da deficiência hídrica.

1.3 Biossíntese do etileno

O etileno é um hormônio vegetal gasoso com alto espectro de influência no desenvolvimento vegetal, como no crescimento e maturação de frutos, dormência, florescimento, expansão foliar, alongamento do colmo, senescência e resposta a estresses (Abeles, Morgan e Saltveit, 1992; Poel, Van de, Smet e Straeten, Van Der, 2015; Yin *et al.*, 2016). A produção de etileno ocorre em qualquer tecido vegetal e é modulada pelos estágios de desenvolvimento e estímulos ambientais (Chang, Schaller e Resnick, 2013), que regulam a expressão e atividade enzimas ACSs e ACOs (Dorling e McManus, 2012).

A via de biossíntese desse hormônio tem início com a conversão da adenosil-L-metionina (AdoMet) pela AdoMet sintase no ciclo de Yang, com o consumo de um ATP. AdoMet então é convertido em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e 5'-metiltioadenosina (MTA) pela ACC sintase (ACS). O MTA é reutilizado para a síntese de metionina enquanto o ACC é convertido em etileno pela enzima ACC oxidase (ACO). Através de reciclagem do MTA, a produção de etileno consegue ser constante mesmo quando os níveis de metionina forem baixos. (Bleecker e Kende, 2000; McKeon, Fernández-Maculet e Yang, 1995). Para regular a quantidade de substrato ou transportá-lo, a ACC ainda pode ser conjugada nas formas de malonil-ACC (MACC), γ -glutamil-ACC (GACC) e jasmonil-ACC (JA-ACC) (Poel, Van de e Straeten, Van Der, 2014). Dentro da via de biossíntese do etileno, as etapas catalisadas por ACS e ACO são consideradas as principais reações regulatórias (Dorling e McManus, 2012).

1.4 Estudos da via do etileno usando mutantes

A primeira evidencia da influência do etileno no crescimento vegetal, observada em 1901 por Neljubov. Este, percebeu que um dos componentes presentes no gás usado como combustível de lâmpadas, podia mudar a orientação do crescimento de ervilheiras. Posteriormente, após isolar os componentes presentes no gás, descobriu que o agente causador

nas mudanças no crescimento observadas anteriormente, eram provocadas pelo hidrocarboneto etileno. Com o tempo, outros grupos de pesquisa realizam novos estudos com a aplicação de etileno em plantas, e observaram efeito o mesmo descrito por Neljubov também em outras espécies, além de descobrirem novas funções desse hormônio no desenvolvimento vegetal (Abeles, Morgan e Saltveit, 2012).

A aplicação de etileno em plântulas *Arabidopsis* resulta no fenótipo característico chamado de tripla resposta: encurtamento e engrossamento do hipocótilo, inibição do crescimento radicular e curvatura exacerbada do gancho apical (Guzmán e Ecker, 1990). Até o momento, os estudos da função e caracterização dos componentes da via do etileno foram feitos usando 4 tipos de mutantes: os mutantes de componentes da biossíntese, insensíveis ao etileno, os de resposta constitutiva e mutantes com insensibilidade em tecidos específicos. O primeiro mutante da via do etileno reportado, foi publicado por Bleecker *et al.* (1988), esse mutante nomeado *ethylene response (etr)*, apresentava alta estatura mesmo quando tratado com etileno, portanto era insensível a esse hormônio. Posteriormente, foi encontrado um mutante com a resposta inversa aos insensíveis, *ethylene overproducer (eto)*. Esse mutante apresentava o fenótipo de tripla resposta, induzida pela aplicação de etileno, mesmo sem nenhum tratamento. Adicionalmente, o fenótipo era revertido quando aplicado inibidores da via da biossíntese do etileno. Como passar do tempo, novos mutantes foram produzidos, o que permitiu estudar a via do etileno com maior precisão: biossíntese: *eto1* (Guzmán e Ecker, 1990), *eto2* e *eto3* (Kieber *et al.*, 1993), *acs1*, *acs2*, *acs4*, *acs5*, *acs6*, *acs7* e *acs9* (Tsuchisaka *et al.*, 2009). Insensíveis: *ein1* e *ein2* (Guzmán e Ecker, 1990), *ein4*, *ein5*, *ein6*, *ein7*, e *eir1* (Roman *et al.*, 1995), resposta constitutiva; *constitutive triple response1 (ctr1)* (Kieber *et al.*, 1993); insensibilidade tecido-específico; *eir1* em raízes, e *hookless1 (hls1)* em hipocótilos (Guzmán e Ecker, 1990).

Para determinar a ordem dos componentes da via o etileno, foi usado principalmente, a estratégia de duplos mutantes de *Arabidopsis*. Quando cruzado dois mutantes com fenótipos contrastantes, o fenótipo presente no duplo mutante indicava que o componente mutado estava a jusante do outro componente mutado (Roman *et al.*, 1995). Outra estratégia empregada para estudar a função de diferentes de isoenzimas da via do etileno, foi feita por (Tsuchisaka *et al.*, 2009), que trabalhou com diversas combinações de mutantes das ACS de *Arabidopsis*. A partir dessas combinações, foi possível caracterizar o papel individual das ACS, bem como, observar que essas enzimas podem formar dímeros, e cada combinação de enzimas, é regulada de maneira complexa através do desenvolvimento.

1.5 Influência do *crosstalk* entre etileno e giberelina no desenvolvimento vegetal.

A giberelina (GA) é um hormônio vegetal que pertence ao grupo dos ácidos carboxílicos diterpênicos tetracíclicos e possui função antagonista ao etileno dependendo do tipo de processo envolvido, como alongamento das raízes, florescimento e indução do gancho apical (Weiss e Ori, 2007). O antagonismo entre os dois hormônios é atribuído às proteínas DELLA, que são repressoras de crescimento e pertencem a família de fatores de transcrição (FT) GRAS (Sun, 2011). Na presença de GA bioativa, as proteínas DELLA ligam-se à ubiquitina e são degradadas pelo proteossoma 26S, impedindo sua ação inibitória no crescimento (Achard e Genschik, 2009). Em *Arabidopsis*, na ausência de GA, as proteínas DELLA ligam-se aos fatores de transcrição (FT) PIF3 e PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR) inibindo suas ações estimulantes da elongação celular. Na presença de etileno os níveis de GA são baixos e a proteína DELLA não é degradada, o que permite sua ação inibitória do crescimento (de Lucas *et al.*, 2008).

A formação do gancho apical em *Arabidopsis* envolve a interação sinérgica etileno-GA, o que induz a expressão do gene *HLS1* (*HOOKLESS1*). Esse processo é mediado pelos fatores de transcrição EIN3/EIL1, que ativam diretamente a transcrição do *HLS1*. A transcrição do *HLS1* também pode ser indiretamente induzida pelo EIN2, que induz a transcrição de *EIN3/EIL1*. A inibição desse processo pela DELLA dá-se pela interação com o sítio de ligação ao DNA dos EIN3/EIL1, bloqueando a indução da transcrição do *HLS1* (An *et al.*, 2012).

DELLA também está relacionado com a resposta a luz e elongação do hipocótilo devido sua interação com as PIFs. As PIFs são proteínas da família dos FT HELIX-LOOP-HELIX (bHLH), importantes reguladores do desenvolvimento fotomorfogênico (Leivar e Monte, 2014). Quando a DELLA liga-se temporariamente no domínio bHLH de ligação ao DNA das PIFs, inibindo sua função de FT (Feng *et al.*, 2008; de Lucas *et al.*, 2008). Em *Arabidopsis* são encontradas cinco PIFs (PIF1, 3, 4, 5 e 6), que interagem com o fitocromo fotoativo (PhyA, B e C) regulando a expressão de genes em resposta a luz durante a fotomorfogênese (Castillon, Shen e Huq, 2007). Quando na presença da luz o fitocromo inibe a expansão celular induzindo a degradação da PIF4 e PIF5 pelo proteossoma. Contudo, a interação PIF-DELLA previne a degradação das PIFs e permite que sejam acumuladas no núcleo. Quando na ausência de luz e presença de GA, o complexo PIF-DELLA é desfeito devido a degradação da DELLA induzida pela GA, liberando as PIFs para indução da elongação celular (de Lucas *et al.*, 2008).

Diferente de espécies modelo como *Arabidopsis*, cana-de-açúcar possui poucos estudos da interação do etileno com giberelina e o impacto no desenvolvimento vegetal. Recentemente nosso grupo revelou a influência da DELLA ScGAI (*GA INSENSITIVE*) em cana-de-açúcar (Tavares *et al.*, 2018). A superexpressão do gene *ScGAI* provocou atrofia das plantas, aumentou o número de perfilhos, ativou genes relacionados com o transporte de açúcar, metabolismo energético e resposta a estresse, reduziu a assimilação de CO₂ e diâmetro do caule. Em contraste, o silenciamento da *ScGAI* teve como resultado plantas com resposta constitutiva ao GA, com maior estatura, desenvolvimento precoce dos nós e entrenós, maior diâmetro do caule e aumento da expressão um *ERF* (*Ethylene Response Factors*), que está envolvido no alongamento dos entrenós em arroz e *Arabidopsis*. As interações ScGAI-EIN3/EIN1 e ScGAI-PIF também foram detectadas, confirmando a importância da DELLA no *crosstalk* etileno-GA no desenvolvimento da cana-de-açúcar.

1.6 Referências

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. J. **Ethylene in Plant Biology**. [s.l.: s.n.].
- ACHARD, P. Ethylene Regulates Arabidopsis Development via the Modulation of DELLA Protein Growth Repressor Function. **the Plant Cell Online**, v. 15, n. 12, p. 2816–2825, 2003.
- ACHARD, P. *et al.* Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. **Science**, 2006.
- _____. Plant DELLAs Restrain Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species. **Current Biology**, v. 18, n. 9, p. 656–660, maio 2008.
- ACHARD, P.; GENSHIK, P. Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown della proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 4, p. 1085–1092, 2009.
- ADAM, M. *et al.* Extraction of antioxidants from plants using ultrasonic methods and their antioxidant capacity. **Journal of Separation Science**, 2009.
- AN, F. *et al.* Ethylene-Induced Stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 Is Mediated by Proteasomal Degradation of EIN3 Binding F-Box 1 and 2 That Requires EIN2 in Arabidopsis. **the Plant Cell Online**, v. 22, n. 7, p. 2384–2401, 2010.
- AN, F. *et al.* Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated Arabidopsis seedlings. **Cell Research**, v. 22, n. 5, p. 915–927, 2012.
- ARNON, D. I. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. **Plant physiology**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1949.
- ASENSI-FABADO, M. A. *et al.* Enhanced oxidative stress in the ethylene-insensitive (ein3-1) mutant of Arabidopsis thaliana exposed to salt stress. **Journal of Plant Physiology**, 2012.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 1996.
- BERNARDO, R. *et al.* Analysis of the agricultural productivity of the sugarcane crop in regions of new agricultural expansions of sugarcane. **Gestao e Producao**, 2019.
- BLEECKER, A. B. *et al.* Insensitivity to Ethylene Conferred by a Dominant Mutation in Arabidopsis thaliana. **Science**, v. 241, n. 4869, p. 1086–1089, 26 ago. 1988.
- BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. **Annual**

Review of Cell and Developmental Biology, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity** *LWT - Food Science and Technology*, 1995.

BULL, T. A; GLASZIOUT, K. T. The evolutionary significance of sugar accumulation in *Saccharum*. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 4, p. 737–742, 1963.

BUSTIN, S.; HUGGETT, J. **qPCR primer design revisited** *Biomolecular Detection and Quantification*, 2017.

CASTILLON, A.; SHEN, H.; HUQ, E. **Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks** *Trends in Plant Science*, 2007.

CAVALCANTE, J. J. V. *et al.* Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 3, p. 673–686, 2007.

CHANG, C.; SCHALLER, G. E.; RESNICK, J. S. Ethylene. **eLS**, n. June, 2013.

CHAO, Q. *et al.* Activation of the ethylene gas response pathway in arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. **Cell**, v. 89, n. 7, p. 1133–1144, 1997.

CHATFIELD, S. P. *et al.* The hormonal regulation of axillary bud growth in Arabidopsis. **Plant Journal**, 2000.

CHONG, B. F. *et al.* Early exposure to ethylene modifies shoot development and increases sucrose accumulation rate in sugarcane. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, n. 2, p. 149–163, 2010.

CONAB. Monitoramento agrícola – Cana-de-açúcar. v. 18, n. 1, 2017.

CUI, M. *et al.* Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in Arabidopsis. **Journal of Plant Biology**, 2015.

CUNHA, C. P. *et al.* Ethylene-induced transcriptional and hormonal responses at the onset of sugarcane ripening. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–18, 2017.

D'HONT, A. *et al.* Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics**,

1996.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, n. DEC, p. 1–13, 2014.

DIAS, M. O. S. *et al.* Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8964–8971, 2011.

DORLING, S. J.; MCMANUS, M. T. The Fate of ACC in Higher Plants. *In: The Plant Hormone Ethylene*. [s.l: s.n.]. v. 44p. 83–115.

FAOSTAT. **Statistics of the Food and Agriculture Organization of the United Nations**. [s.l: s.n.].

FENG, S. *et al.* Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 475–479, 2008.

FERRARO, D. O.; RIVERO, D. E.; GHERSA, C. M. An analysis of the factors that influence sugarcane yield in Northern Argentina using classification and regression trees. **Field Crops Research**, v. 112, n. 2–3, p. 149–157, 2009.

FILIPECKI, M.; MALEPSZY, S. Unintended consequences of plant transformation: A molecular insight. **Journal of Applied Genetics**, v. 47, n. 4, p. 277–286, dez. 2006.

GABRIELE, S. *et al.* The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene AtGA3ox1. **Plant Journal**, 2010.

GALLEGO-BARTOLOME, J. *et al.* Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 33, p. 13446–13451, 2012.

GEPSTEIN, S.; THIMANN, K. V. The Role of Ethylene in the Senescence of Oat Leaves. **PLANT PHYSIOLOGY**, 2008.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. **Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants** *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010.

GUIDELLI, G. *et al.* **pGVG: a new Gateway-compatible vector for transformation of sugarcane and other monocot crops**. [s.l: s.n.].

GUZMAN, P. Exploiting the Triple Response of *Arabidopsis* To Identify Ethylene-Related

Mutants. **THE PLANT CELL ONLINE**, 1990.

GUZMÁN, P.; ECKER, J. R. Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. **The Plant Cell**, v. 2, n. 6, p. 513–523, jun. 1990.

HARPAZ-SAAD, S. *et al.* The Formation of ACC and Competition Between Polyamines and Ethylene for SAM. **The Plant Hormone Ethylene**, v. 44, p. 53–81, 2012.

HERMANN, E. R.; CÂMARA, G. M. S. Um Método Simples para Estimar a Área Foliar da Cana-de-Açúcar. **STAB**, v. 17, n. 5, p. 32–34, 1999.

HUA, J. *et al.* Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis EPS gene. **Science**, v. 269, n. 5231, p. 1712–1714, 1995.

JAIN, R. *et al.* Influence of bud sett soaking with ethephon and its foliar application on growth, biochemical attributes and gene expression in sugarcane. **Journal of Environmental Biology**, v. 39, n. 4, p. 472–480, 1 jul. 2018.

JANSSEN, R.; RUTZ, D. D. Sustainability of biofuels in Latin America: Risks and opportunities. **Energy Policy**, v. 39, n. 10, p. 5717–5725, 2011.

KHAN, N. A. *et al.* The application of ethephon (an ethylene releaser) increases growth, photosynthesis and nitrogen accumulation in mustard (*Brassica juncea* L.) under high nitrogen levels. **Plant Biology**, v. 10, n. 5, p. 534–538, 2008.

KHANNA, R. *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor PIF5 acts on ethylene biosynthesis and phytochrome signaling by distinct mechanisms. **Plant Cell**, 2007.

KIEBER, J. J. *et al.* CTRI , a Negative Regulator of the Ethylene Pathway in Arabidopsis, Encodes a Member of the Raf Family of Protein Kinases. **Cell**, v. 72, n. 3, p. 427–441, 1993.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, 2018.

LANAHAN, M. B. *et al.* The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. **The Plant Cell**, v. 6, n. 4, p. 521–530, abr. 1994.

LARKIN, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 2007.

LEE, S. *et al.* Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. **Genes and Development**, 2002.

- LEIVAR, P.; MONTE, E. PIFs: Systems Integrators in Plant Development. **The Plant Cell**, v. 26, n. 1, p. 56–78, 2014.
- LI, Y.; SOLOMON, S. Ethephon: A versatile growth regulator for sugar cane industry. **Sugar Tech**, v. 5, n. 4, p. 213–223, 2003.
- LI, Z. *et al.* The ethylene response factor AtERF11 that is transcriptionally modulated by the bZIP transcription factor HY5 is a crucial repressor for ethylene biosynthesis in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 68, n. 1, p. 88–99, 2011.
- LIANG, X. *et al.* Characterization of two members (ACS1 and ACS3) of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of Arabidopsis thaliana. **Gene**, v. 167, n. 1–2, p. 17–24, 1995.
- LIN, Z. *et al.* A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. **Plant Journal**, v. 55, n. 2, p. 301–310, 2008.
- LIU, C. *et al.* Ethylene insensitive mutation improves Arabidopsis plant tolerance to NO₂ exposure. **Ecotoxicology and environmental safety**, 2020.
- LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 163, n. 1, p. 16–20, maio 1987.
- LUCAS, M. DE *et al.* A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 480–484, 2008.
- LV, S. F. *et al.* The dependence of leaf senescence on the balance between 1-aminocyclopropane-1-carboxylate acid synthase 1 (ACS1)-catalysed ACC generation and nitric oxide-associated 1 (NOS1)-dependent NO accumulation in Arabidopsis. **Plant Biology**, v. 1, p. 1–9, 2019.
- LYZENGA, W. J.; BOOTH, J. K.; STONE, S. L. The Arabidopsis RING-type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7. **Plant Journal**, 2012.
- MAREUIL, F.; DOPPELT-AZEROUAL, O.; MÉNAGER, H. A public Galaxy platform at Pasteur used as an execution engine for web services. 2017.
- MATTIELLO, L. *et al.* Physiological and transcriptional analyses of developmental stages along sugarcane leaf. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–21, 2015.

- MCCARTHY, D. L. *et al.* Glutamate 47 in 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase is a major specificity determinant. **Biochemistry**, 2001.
- MCCORMICK, A. J.; CRAMER, M. D.; WATT, D. A. Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. **New Phytologist**, v. 171, n. 4, p. 759–770, set. 2006.
- MCKEON, T. A.; FERNÁNDEZ-MACULET, J. C.; YANG, S.-F. Biosynthesis and Metabolism of Ethylene. *In*: DAVIES, P. J. (Ed.). . **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1995. p. 118–139.
- MITTLER, R. *et al.* **Reactive oxygen gene network of plants** **Trends in Plant Science**, 2004.
- MOORE, P. Temporal and Spatial Regulation of Sucrose Accumulation in the Sugarcane Stem. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 4, p. 661, 1995.
- MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 32–41, 2015.
- NOMOTO, Y. *et al.* Circadian clock-and PIF4-controlled plant growth: A coincidence mechanism directly integrates a hormone signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 11, p. 1950–1964, 2012.
- OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027**. [s.l.] OECD, 2018.
- OH, E. *et al.* PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. **Plant Cell**, 2007.
- PAEPE, A. DE *et al.* Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 39, n. 4, p. 537–559, 2004.
- PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; D'HONT, A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**, 2010.
- POEL, B. VAN DE; SMET, D.; STRAETEN, D. VAN DER. Ethylene and Hormonal Cross Talk in Vegetative Growth and Development. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 61–72, 2015.
- POEL, B. VAN DE; STRAETEN, D. VAN DER. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid

(ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. November, p. 1–11, 2014.

RIAÑO-PACHÓN, D. M.; MATTIELLO, L. Draft genome sequencing of the sugarcane hybrid SP80-3280. **F1000Research**, v. 6, p. 861, 2017.

ROBERTO, G. G. *et al.* Variação da fotossíntese e dos teores de carboidratos induzidos por etefom e déficit hídrico na fase de maturação da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 74, n. 4, p. 379–386, 2015.

ROMAN, G. *et al.* Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: Five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. **Genetics**, 1995.

SEBASTIÀ, C. H. *et al.* Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2004.

SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. *In*: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E. ET. AL. (Ed.). . **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. 1. ed. Piracicaba: Livrocere, 2006. p. 19–36.

SILVA, M. DE A.; CAPUTO, M. M. C. Ripening and the Use of Ripeners for Better Sugarcane Management. *In*: **Crop Management - Cases and Tools for Higher Yield and Sustainability**. [s.l.] InTech, 2012. .

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. **American journal of enology and viticulture**, 1965.

SOLANO, R. *et al.* Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. **Genes & Development**, v. 12, n. 23, p. 3703–3714, 1 dez. 1998.

SOUZA DIAS, M. O. DE *et al.* Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015.

SREENIVASAN, T. V.; AHLOOWALIA, B. S.; HEINZ, D. J. Cytogenetics. *In*: HEINZ, D. J. (Ed.). . **Sugarcane improvement through breeding**. [s.l: s.n.]. p. 211–253.

SUN, G. *et al.* N-terminus-mediated degradation of ACS7 is negatively regulated by senescence signaling to allow optimal ethylene production during leaf development in *Arabidopsis*.

Frontiers in Plant Science, 2017.

SUN, T. P. The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. **Current Biology**, v. 21, n. 9, p. 338–345, 2011.

TAVARES, R. *et al.* ScGAI is a key regulator of culm development in sugarcane. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 16, p. 3823–3837, 2018.

TAVARES, R. G. **ACC SINTASE EM CANA DE AÇÚCAR: ESTUDOS DE REGULAÇÃO GÊNICA E APLICAÇÃO**. [s.l.] UNICAMP, 2011.

THOLEN, D. *et al.* Ethylene Insensitivity Results in Down-Regulation of Rubisco Expression and Photosynthetic Capacity in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 1305–1315, 2007.

THOLEN, D.; VOESENEK, L. A. C. J.; POORTER, H. Ethylene Insensitivity Does Not Increase Leaf Area or Relative Growth Rate in Arabidopsis, Nicotiana tabacum, and Petunia x hybrida . **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p. 1803–1812, 2004.

TSIROPOULOS, I. *et al.* Life cycle impact assessment of bio-based plastics from sugarcane ethanol. **Journal of Cleaner Production**, 2015.

TSUCHISAKA, A. *et al.* A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in Arabidopsis thaliana. **Genetics**, v. 183, n. 3, p. 979–1003, 2009.

TYLER, L. *et al.* DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis [wI. v. 135, n. 2, p. 1008–1019, 2015.

VARGAS MORES, G. DE *et al.* Sustainability and innovation in the Brazilian supply chain of green plastic. **Journal of Cleaner Production**, 2018.

WACLAWOVSKY, A. J. *et al.* Sugarcane for bioenergy production: An assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 3, p. 263–276, 2010.

WANG, H. *et al.* Ethylene-insensitive mutants of Nicotiana tabacum exhibit drought stress resistance. **Plant Growth Regulation**, v. 79, n. 1, p. 107–117, 2016.

WEISS, D.; ORI, N. Mechanisms of Cross Talk between Gibberellin and Other Hormones. **Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 1240–1246, 2007.

WELBAUM, G. E.; MEINZER, F. C. Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. **Plant physiology**, v. 93, n. 3, p. 1147–1153, 1990.

WU, K. *et al.* Effects of spraying ethephon on the canopy structure and the physiological indexes for drought resistance in sugarcane. **Southwest China Journal of Agricultural Sciences**, 2004.

XIE, Z. *et al.* AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. February, p. 1–17, 2019.

YAMAGAMI, T. *et al.* Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 49, p. 49102–49112, 2003.

YANG, L.; ZU, Y. G.; TANG, Z. H. Ethylene improves Arabidopsis salt tolerance mainly via retaining K⁺ in shoots and roots rather than decreasing tissue Na⁺ content. **Environmental and Experimental Botany**, 2013.

YIN, X. R. *et al.* Involvement of an ethylene response factor in chlorophyll degradation during citrus fruit degreening. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 86, n. 5, p. 403–412, 2016.

YOSHIDA, H. *et al.* Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. **BMC Plant Biology**, v. 5, p. 1–13, 2005.

ZHONG, S. *et al.* A molecular framework of light-controlled phytohormone action in arabidopsis. **Current Biology**, v. 22, n. 16, p. 1530–1535, 2012.

2 DESVENDANDO O PAPEL DE ETILENO EM CANA-DE-AÇÚCAR

Daniel Moreira Neris¹, Lucia Mattiello¹, Marcelo Menossi Teixeira¹

¹ Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Resumo

Diversas evidências indicam que o hormônio etileno está envolvido em processos de grande interesse na cana-de-açúcar, como o crescimento e acúmulo de sacarose. A falta de mutantes para genes da biossíntese ou sinalização do etileno dificulta a compreensão mais profunda sobre o papel desse hormônio vegetal na cana-de-açúcar. Este estudo teve como objetivo estudar as implicações fisiológicas e desenvolvimentais de plantas de cana-de-açúcar (cultivar SP8032-80) com baixa produção de etileno. Para atingir este objetivo foram silenciados os genes que codificam a ÁCIDO 1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXÍLICO SINTASE (ACS), responsável por uma etapa limitante da via de biossíntese do etileno. O silenciamento foi feito usando a técnica de RNA de interferência, que teve como alvo os genes *ScACS1*, *ScACS2* e o *ScACS3*, cujas sequências foram identificadas e as proteínas classificadas como ACS do tipo 2. Foi possível observar que plantas de cana-de-açúcar com níveis reduzidos de etileno apresentaram aumento do crescimento, velocidade da germinação de gemas laterais e maior ativação de mecanismos antioxidantes não-enzimáticos. Paralelamente, foi observado o aumento da expressão do *ScACO5*, que codifica a enzima sintetizadora do etileno, e do fator de transcrição *ScERF1*, ligado a resposta ao etileno. Acompanhando o aumento da estatura das plantas, foi observado o aumento da expressão dos *ScPIF3*, *ScPIF4* e *ScPIF5*, fatores de transcrição relacionados com indução do crescimento. Curiosamente, houve aumento também da expressão do gene *ScGAI*, que codifica uma proteína DELLA, ligado à repressão do crescimento. O conteúdo final de sacarose nos colmos não foi afetado pelos baixos níveis de etileno, embora a taxa de assimilação de CO₂ tenha sido reduzida. Este trabalho apresentou pela primeira vez os impactos da baixa produção endógena do etileno em cana-de-açúcar, que apresenta potencial, para guiar futuros estudos da via desse hormônio. Além disso, as plantas aqui usadas são um valioso instrumento para ajudar a elucidar os mecanismos moleculares por trás das respostas ao etileno, visando o aumento da produtividade da cultura.

Palavras-chave: cana-de-açúcar; etileno; silenciamento; *ScACS*; desenvolvimento;

2.1 Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) é uma das principais culturas usadas na produção de biocombustíveis, devido seu alto potencial na produção de etanol e ser uma fonte renovável de energia, o que contribui para a redução da emissão de gases do efeito estufa (Waclawovsky *et al.*, 2010). Além disso, 85% da produção mundial de açúcar é oriunda da cana-de-açúcar (OECD/FAO, 2018), dos quais 40% é produzido no Brasil (Ferraro, Rivero e Ghera, 2009), colocando-o como maior produtor de açúcar do mundo (Conab, 2019; Janssen e Rutz, 2011). Adicionalmente, a cana-de-açúcar pode ser usada na produção de energia elétrica, fertilizantes orgânicos (Souza Dias, de *et al.*, 2015), plástico biodegradável (de Vargas Mores *et al.*, 2018) e etanol de segunda geração (Dias *et al.*, 2011). Apesar dos grandes esforços no desenvolvimento de tecnologias e pesquisas usando melhoramento convencional, na última década o aumento da produtividade da cana-de-açúcar manteve-se muito abaixo do observado em culturas como milho e soja (Bernardo *et al.*, 2019), o que chama a atenção para o uso de abordagens diferentes objetivando decifrar as bases moleculares por trás processos como maturação e crescimento dessas plantas.

A maturação da cana-de-açúcar baseia-se no acúmulo de açúcar, produto da fotossíntese, nas células parenquimáticas do colmo (McCormick, Cramer e Watt, 2006). Nesse processo a concentração de açúcar nos colmos podem atingir 700 mM e representar 27% de toda a massa fresca (Bull e Glasziout, 1963; Moore, 1995; Welbaum e Meinzer, 1990). A maturação, bem como todos os processos fisiológicos e respostas ao ambiente, são controlados por hormônios vegetais, como o etileno. Em cana-de-açúcar, parte do manejo é feito através aplicação de maturadores liberadores de etileno como o Ethephon, que paralisa o crescimento meristemático, antecipa o processo de maturação e aumenta a concentração de açúcares no colmo, permitindo maior flexibilidade e produtividade da colheita (Silva e Caputo, 2012).

A aplicação pontual de maturadores também é a principal ferramenta para estudar o papel e a via do etileno em cana-de-açúcar, uma vez que, a grande complexidade do genoma desse híbrido torna inviável a produção de mutantes da via desse hormônio como é feito em *Arabidopsis* e em outras plantas modelo (Guzman, 1990; Lanahan *et al.*, 1994; Tsuchisaka *et al.*, 2009). A avaliação de plantas de cana-de-açúcar de duas cultivares (IACSP94-2094 e IACSP95-5000) com 10 meses, mostrou que a resposta ao tratamento com Ethephon é genótipo-dependente. Nesse caso o genótipo responsivo (IACSP95-5000) apresentou aumento da biomassa, assimilação de CO₂ e conteúdo de sacarose no colmo (Roberto *et al.*, 2015). Na avaliação de plantas de cana-de-açúcar cultivar KQ228 após 2 e 3½ meses da aplicação de Ethephon constataram-se mudanças no acúmulo de açúcares no colmo e mudanças no

crescimento. Nas plantas avaliadas após 2 meses de aplicação houve aumento de sacarose, frutose e glicose nos colmos, enquanto o aumento do número de entrenós, altura das plantas, massa fresca e perfilhamento puderam ser observadas em ambos pontos de amostragem. Adicionalmente, nas plantas após 3 meses da exposição ao Ethephon foi verificado o aumento da assimilação de CO₂, condutância estomática, transpiração, conteúdo de clorofila e redução do crescimento e massa fresca das folhas. (Chong *et al.*, 2010). Cunha *et al.*, 2017 demonstraram que a aplicação de Ethephon e um inibidor da via de biossíntese do etileno (AVG, 1-Metilciclopropeno) em plantas com 10 meses (cultivar IACSP95-5000) desencadeiam respostas complexas envolvendo a expressão de genes da via do etileno, e, paralelamente, influenciam a expressão genes da via de outros hormônios e metabolismo da sacarose.

A biossíntese do etileno ocorre em qualquer tecido vegetal, sendo modulada pelos estágios de desenvolvimento e estímulos ambientais (Chang, Schaller e Resnick, 2013) e tem início com a conversão da adenosil-L-metionina (AdoMet) pela AdoMet sintase no ciclo de Yang, com o consumo de um ATP. AdoMet então é convertido em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e 5'-metil-tioadenosina (MTA) pela ACC sintase (ACS). O MTA é reciclado para a produção de metionina enquanto o ACC é convertido em etileno pela ACC oxidase (ACO). A reciclagem do MTA permite que a produção de etileno mantenha-se constante mesmo com os níveis baixos de metionina (Bleecker e Kende, 2000; McKeon, Fernández-Maculet e Yang, 1995). A ACC ainda pode ser conjugada nas formas de malonil-ACC (MACC), γ -glutamil-ACC (GACC) e jasmonil-ACC (JA-ACC) para regular a quantidade de substrato disponível para a produção de etileno ou serem transportados (Poel, Van de e Straeten, Van Der, 2014). As reações que são catalisadas pelas enzimas ACS e ACO, ambas consideradas etapas regulatórias da biossíntese de etileno (Dorling e McManus, 2012), o que as tornam um objeto de estudo interessante.

As ACS são proteínas codificadas uma família multigênica, na qual cada membro é diferencialmente regulado à nível transcricional por estímulos ambientais e desenvolvimentais, o que reflete diretamente nos níveis na quantidade de etileno produzido (Lin *et al.*, 2008). Tsuchisaka *et al.* (2009) ao trabalhar com mutantes múltiplos de *acs* em *Arabidopsis*, observaram que as plantas produzindo menos etileno apresentaram mudanças drásticas no crescimento e desenvolvimento, como aumento da estatura das plantas, retardo da senescência e suscetibilidade a patógenos. Também foi observado a formação de homodímeros e heterodímeros entre as ACS, onde cada combinação de dímeros respondem a estímulos diferentes, o que permite uma complexa rede de regulação da via de biossíntese do etileno. Em

Arabidopsis as ACSs são codificadas por uma família composta por 12 genes, no entanto, nem todas estão relacionadas com a biossíntese de etileno. Essas enzimas apresentam grande similaridade da cadeia polipeptídica na região do domínio catalítico, portanto a classificação dessas proteínas é feita baseada na presença de resíduos de serina relacionados à regulação na região C-terminal. As ACSs do tipo 1 apresentam uma extensão no C-terminal com três sítios de fosforilação pela MAPK (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES) e um sítio de fosforilação pela CDPK (CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE); as do tipo 2 apresentam extensão do C-terminal menor que as do tipo 1 e um sítio de fosforilação pela CDPK; as do tipo 3 apresentam uma curta extensão do C-terminal e a ausência de sítios de fosforilação. Quando desfosforiladas, as ACS do tipo 1 e 2 são encaminhadas para a degradação via proteossoma 26S, (Harpaz-Saad *et al.*, 2012). Os mecanismos de regulação das ACSs do tipo 3 ainda não são claros, porém sabe-se que a desestabilização dessas enzimas pode ser mediada por resíduos presentes na região N-terminal (Sun *et al.*, 2017), assim como pela ubiquitinação feita pela E3 ubiquitina-ligase XB3 (Lyzenga, Booth e Stone, 2012). Até o momento foram caracterizadas duas ACSs em cana-de-açúcar, nomeadas com ScACS1 (tipo 1) e ScACS2 (tipo 3) (Tavares, 2011).

No presente estudo foi identificado uma terceira ACS em cana-de-açúcar, nomeada como ScACS3 e classificada como tipo 3. Posteriormente, para estudar a influência da baixa produção de etileno na fisiologia e crescimento da cana-de-açúcar em todo seu ciclo de vida, foram silenciados os 3 genes *ScACS* através da técnica de RNA de interferência (RNAi). Em resposta aos baixos níveis de etileno endógeno, foi observado que as plantas apresentam aumento na velocidade da germinação e estatura nos meses iniciais, juntamente com a expressão dos fatores de transcrição *ScPIF3*, *ScPIF4* e *ScPIF5* nas folhas e colmo, o que pode estar intimamente relacionado com a indução do crescimento. Curiosamente, foi observado algumas respostas geralmente induzidas pelo etileno, como aumento da expressão do *ScACO5*, *ScERF1* e *ScGAI* nas folhas e colmo, e investimento no aparato antioxidante não-enzimático. Diferente do esperado a redução dos níveis de etileno não interferiu no conteúdo de sacarose nos colmos das plantas maduras. Não podemos descartar, porém, que essa resposta pode estar sendo influenciada pela limitação imposta pelo cultivo em casa de vegetação, uma vez que o fenótipo observado nas plantas jovens desaparece progressivamente com o tempo. Os resultados apresentados neste artigo fornecem bases para estudos futuros, visando entender com maior profundidade a influência do etileno na produtividade e desenvolvimento da cana-de-açúcar.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Identificação e classificação do gene *ScACS3*

Até o momento foram publicadas a identificação de duas ACS em cana-de-açúcar, *ScACS1* (JF274985) e *ScACS2* (JF274986) (Tavares, 2011). Contudo, usando o genoma da cana-de-açúcar (Riaño-Pachón e Mattiello, 2017) foi possível identificar a sequência de uma terceira *ScACS*. Para comparar e classificar essa possível *ScACS3*, foi feito o alinhamento usando o programa ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) e a filogenia pelo método *neighbor-joining* com *bootstrap* de 1000 replicatas no programa MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018). Para os testes foram usadas as sequências proteicas das duas ACS de cana-de-açúcar (*ScACS1* (ADZ96243.1) e *ScACS2* (ADZ96244.1); Figura suplementar 1) (Tavares, 2011), das 9 ACSs funcionais de *Arabidopsis* ((*ACS1* (AT3G61510.1), *ACS2* (AT1G01480.1), *ACS4* (AT2G22810.1), *ACS5* (AT5G65800.1), *ACS6* (AT4G11280.1), *ACS7* (AT4G26200.1), *ACS8* (AT4G37770.1), *ACS9* (AT3G49700.1), *ACS11* (AT4G08040.1)) (Tsuchisaka *et al.*, 2009) e da possível *ScACS3*(AAV63950.1) (Figura suplementar 1).

2.2.2 Transformação das plantas

Plantas de cana-de-açúcar do cultivar SP8032-80 foram transformadas com um cassete de expressão para transcrição de um RNAi que possui como alvo regiões dos genes *ScACS1*, *ScACS2* e *ScACS3*. Essas regiões foram selecionadas usando o *software* Galaxy (Mareuil, Doppelt-azeroual e Ménager, 2017) (Figura suplementar 1). O cassete de expressão foi inserido no vetor pGVG (Figura 1) e calos de cana foram transformados pela empresa PangeiaBiotech (Campinas, SP, Brasil) empregando *Agrobacterium tumefaciens* (Guidelli *et al.*, 2017). As plantas obtidas e adaptadas em casa de vegetação foram chamadas de R0 (“*Regenerated*”, geração zero) e a plantas produzidas a partir de toletes de plantas R0 contendo as gemas laterais (*seedcane* em inglês) foram chamadas de S1.

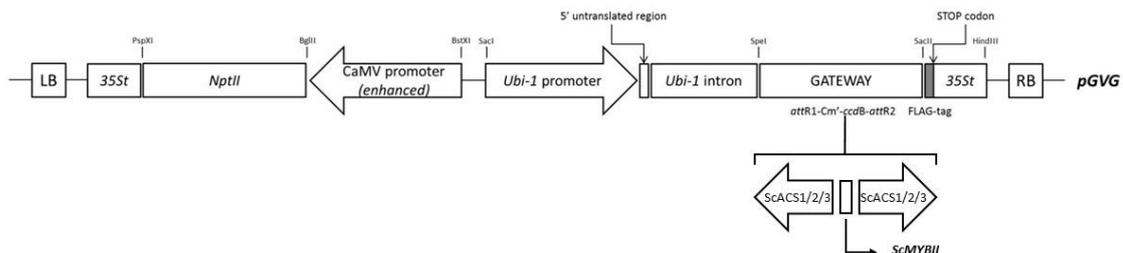


Figura 1: Vetor pGVG_hpACS123 usado para produção das plantas transgênicas. A expressão do transcrito é controlada pelo promotor *ZmUbi1* (com éxon não traduzível e um íntron na extremidade 5') e pela região 3' não traduzida CaMV 35S. Uma FLAG-tag está posicionada *upstream* à região 3' não traduzida. O marcador de seleção vegetal é o gene *NPTII*, controlado

pelo promotor CaMV 35S. Cmr: gene de resistência cloranfenicol. *ccdB*: gene letal. RB: borda direita do vetor. LB: borda esquerda do vetor. O *backbone* do vetor pGVG é uma versão modificada do pCAMBIA2300 (CAMBIA, Canberra, Austrália) (Guidelli et al., 2018). No vetor final o *hairpin* foi inserido no lugar do Cmr e *ccdB*, via recombinação com as regiões *attR1* e *attR2*.

2.2.3 Quantificação de etileno

Para quantificação da produção de etileno de todas as plantas R0 ainda em condição *in vitro*, 3 plantas de cada evento independente foram colocadas individualmente em frascos de vidros de 18 ml contendo 2 ml de meio MS líquido com metade dos sais e selados por 24 h. Após esse período 1 ml do ar do *headspace* dos frascos foi coletado e injetado no cromatógrafo gasoso (CG). Para fazer a caracterização da produção de etileno planta foram coletados 16 discos de 6 mm das folhas +1, para cada evento foi usado 3 de plantas R0 com 7 meses. Os discos foram pesados e armazenados em frascos de 18 ml hermeticamente fechados e protegidos da luz por 24 h. Usando uma seringa, 1 ml do ar contido no *headspace* foi coletado e injetado diretamente no CG para a quantificação de etileno. As leituras foram feitas no CG modelo Agilent 6890 Plus (Aligent, EUA) e a análise dos cromatogramas feita usando o programa MSD ChemStation (Aligent, EUA). Para calcular a quantidade de etileno liberada foi levada em consideração a quantidade de ar presente no *headspace*, a quantidade amostrada e o peso fresco de cada planta.

2.2.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

O terço médio das folhas +1 das plantas S1 com 3 meses e os colmos das plantas com 6 meses foram coletados entre 11h00 e 12h00 horas, imediatamente submersos em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados à -80 °C. O RNA total de folhas e colmos foi extraído usando o protocolo de guanidina descrito por Logemann, Schell e Willmitzer (1987), com a etapa adicional de precipitação com acetato de sódio 3M (pH 5.2). A integridade do RNA foi analisada em gel desnaturante de agarose, enquanto a pureza e concentração do RNA foram analisadas usando um Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EUA). Por fim, o tratamento com DNase foi feito usando DNase I Amplification Grade (Invitrogen, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A eficiência do tratamento com DNase I foi avaliada por reações de PCR usando os primers do promotor da *ScACSI* (Fw: GTAGGGGTTCTCGTCGTAGGCTTTCC; Rv: AGAGGAGATGATGCTCGGCACTGCTAC) e verificando a presença de bandas em gel de Agarose (TAE 1X e 1% de agarose (p/v)). Quando confirmada a presença de gDNA um novo tratamento com DNase I era realizado. A síntese de cDNA foi feita a partir de 3 µg de RNA

usando a enzima SuperScript® III (Invitrogen, EUA) segundo o protocolo do fabricante, e armazenado à -20°C.

2.2.5 Expressão gênica usando qPCR

Foi avaliado o padrão de expressão dos 3 genes *ScACS* silenciados: *ScACS1* (acesso ADZ96243.1), *ScACS2* (ADZ96244.1) e *ScACS3* (AAV63950.1). Também foi avaliado a expressão dos genes responsivos a mudança dos níveis de etileno em cana-de-açúcar (Cunha *et al.*, 2017): *ACO5* (*ACC OXIDASE5*, CA116504.1), *EIL1* (*ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1*, MG766285.1), *EIL3* (*ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE3*, CA190765.1), *ERF1* (*ETHYLENE RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR1*, CA101597.1); dos 3 FTs indutores do crescimento: *ScPIF3* (*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3*; MG766281), *ScPIF4* (*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR4*; MG766282), *ScPIF5* (*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR5*; MG766283); e do *ScGAI* (*GA-INSENSITIVE*; MG766280), com função inibitória do crescimento. A reação de qPCR foi feita usando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, EUA) e o equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems, EUA). A reação foi composta de 2X GoTaq® qPCR Master Mix, 200 mM de cada primer 1 µl de cDNA (1:10) com volume final de 12 µl. Essa análise foi executada com três réplicas biológicas, três réplicas técnicas e poliubiquitina como controle endógeno (Papini-Terzi *et al.*, 2009). Os valores de *cycle threshold* (Ct) foram obtidos usando o *software* ExpressionSuite Software v1.1 e a expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os primers para *ScACSs* e *ScPIFs* foram desenhados usando Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) com os parâmetros e testes de eficiência baseados em (Bustin e Huggett, 2017). Os primers dos FTs da via do etileno foram obtidos em Cunha *et al.* (2017) e os do gene *ScGAI* em Tavares *et al.* (2018) (Tabela suplementar 1).

2.2.6 Avaliação biométrica

Para avaliar o impacto da baixa produção endógena de etileno alguns parâmetros biométricos, geralmente relacionados com esse hormônio, foram aferidas. Usando 5 plantas de cada evento independente, foi obtida a altura das plantas, número de perfilhos (NP), comprimento das folhas (CF), largura das folhas (LF) e a área foliar (AF) pelo método descrito por Hermann e Câmara (1999).

2.2.7 Quantificação de clorofila

O conteúdo de clorofila foi determinado usando 50 mg de material macerado coletado de folhas +1 das plantas S1 com 6 meses. Os pigmentos foram extraídos com etanol

70% e a absorvância da solução etanólica medida em espectrofotômetro (665 nm e 645 nm), os valores de clorofila a, b e total (a + b) foram obtidos pelas equações descritas por Arnon (1949).

2.2.8 Avaliação da Fotossíntese

As medições de trocas gasosas foram realizadas, entre 10h00 e 12h00, na porção média da folha +1. Os dados de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*G_s*) e transpiração (*E*) foram coletados após exposição das folhas a 1.500 μmol m⁻² s⁻¹ de luz e uma concentração constante de CO₂ de 400 μmol⁻¹ usando um analisador de gás por infravermelho Li-6400 XT (LiCor, EUA).

2.2.9 Teste de Germinação

As gemas usadas no teste de germinação foram coletadas das plantas S1 com 8 meses, preservando 3 cm de entrenós em cada lado da gema e selecionando aquelas entre 2,5 e 3 gramas. As gemas foram germinadas em bandejas plásticas com composto orgânico classe A (Genfertil, Brasil) como substrato e irrigação diária, tomando o cuidado de manter as gemas sempre cobertas por substrato. O número de gemas germinadas foi monitorado por 21 dias.

2.2.10 Atividade antioxidante não enzimática

O extrato das folhas +1 usado para a avaliação do poder redutor dos íons ferro (FRAP), taxa de captura de radicais livres (%DPPH) e conteúdo de fenóis foi feito como descrito por (Adam *et al.*, 2009). A %DPPH foi avaliada como Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), avaliando consumo de DPPH pelo extrato usando à 517 nm por 5 minutos. A avaliação do FRAP do extrato foi feita pelo método descrito por Benzie e Strain (1996), medindo a capacidade do extrato em reduzir os íons Fe³⁺ e Fe⁺² pela formação do composto azul tripiridiltriazina à 593 nm. O FRAP foi representado em equivalentes da atividade antioxidante do ácido ascórbico (EAA). O conteúdo de fenóis foi mensurado pelo método Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965), usando ácido gálico como padrão à 765 nm. As medidas da absorvância foram feitas em espectrofotômetro 8453 UV-VIS (Agilent, EUA).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Alinhamento e filogenia das ACS

A análise das sequências de *ScACS1*, *ScACS2* e *ScACS3* (Figura suplementar 1) revelaram que esses genes, apresentam região codificante de 1464, 1401 e 1476 pb, respectivamente, e quando traduzidas dão origem às sequências peptídicas e massas preditas com 487 (54 kDa), 466 (51 kDa) e 491 (53,5 kDa) aminoácidos. Comparando as sequências proteicas foi constatado que *ScACS1* e *ScACS2* possuem 53,5% de similaridade, *ScACS1* e

ScACS3 possuem 50,96% e ScACS2 e ScACS3 possuem 58,99%. Assim como em *Arabidopsis* (Yamagami *et al.*, 2003), as ScACSs possuem tamanhos e massa semelhantes, porém apresentam alta dissimilaridade na sequência de aminoácidos.

Devido à alta dissimilaridade nas sequências proteicas das ACS, a identidade dessas isoenzimas são determinadas pela presença de 7 *boxes* conservadas ao longo das sequências (Yamagami *et al.*, 2003). Adicionalmente, as propriedades enzimáticas das ACS são determinadas pela presença de resíduos específicos e invariáveis em todas enzimas as funcionais (Figura 2). O glutamato (E) presente no *box* 1 e um resíduo de tirosina (Y) do *box* 2 conferem especificidade ao substrato (McCarthy *et al.*, 2001), enquanto o motivo PSN no *box* 4 está relacionado com a atividade enzimática (Liang *et al.*, 1995). Mutações nessas regiões altamente conservadas fazem com que as propriedades enzimáticas de ACS sejam comprometidas. As três ScACSs avaliadas apresentam os 7 *boxes* que caracterizam a família das ACS, não apresentando nenhuma modificação nas regiões relacionadas com as propriedades enzimáticas.

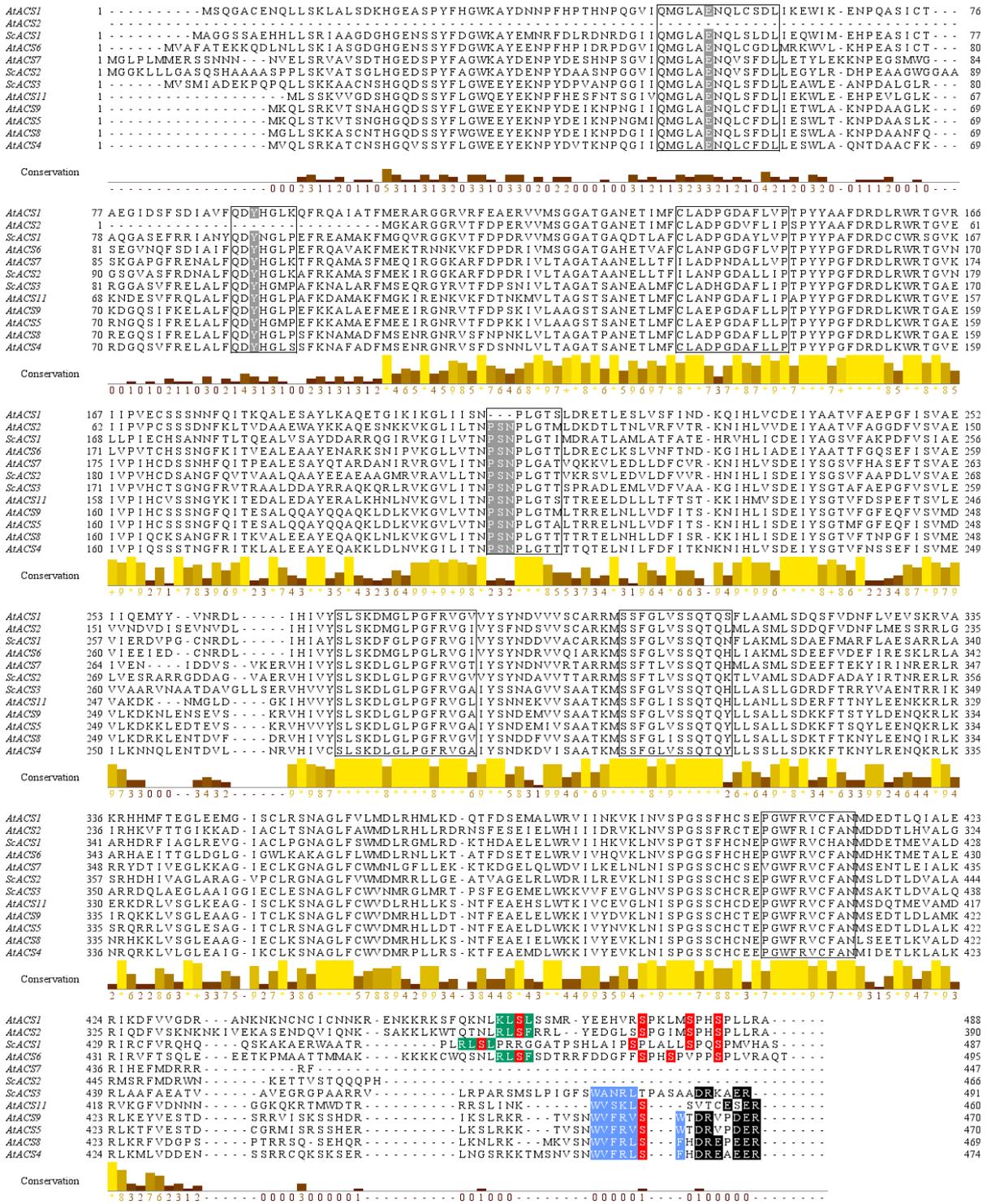


Figura 2: Alinhamento das sequências proteicas dos ScACs e AtACs. Estão indicados na figura: sete regiões conservadas na família das ACSs (caixas); Resíduos E e Y responsáveis pela especificidade enzimática e PSN relacionado com atividade enzimática (cinza); Resíduos de S alvos de fosforilação (vermelho); *Motif* RLSF/RLSL que interage com a CDPK (verde) nas ACS do tipo 1; Domínio TOE necessário para fosforilação pela CDPK e interação com ETO1 nas ACS o tipo 2 (azul); Região rica em região rica em D/R/E necessária para interação com a ETO1 (preto). As barras abaixo indicam o grau de conservação.

Na análise filogenética foi possível identificar que as ScACSs e AtACSs foram agrupados em três grupos diferentes baseados nas características do C-terminal (Figura 3). As isoenzimas do tipo 1 apresentam região C-terminal longa, cerca de 50 aminoácidos, com 3 resíduos de serina alvos de fosforilação pela MAPK e um motivo (RLSF) alvo de fosforilação pela CDPK (Figura 2). Na ScACS1 esse motivo possui uma troca de RLSF para RLSL, porém essa mudança não aparenta ser significativa já que F/L são aminoácidos hidrofóbicos (Sebastià *et al.*, 2004). A região C-terminal do tipo 2 possui cerca de 40 aminoácidos, com um resíduo de serina alvo de fosforilação pela CDPK, um domínio TOE e uma região rica em aspartato (D), glutamato (E) e arginina (R). O motivo de que interage com a CDPK está presente no domínio TOE, uma vez que esse motivo é desfosforilado, o domínio TOE (WVFRLSF ou WVFRVSW) pode interagir com a proteína ETO1 (ETHYLENE-OVERPRODUCER1) que sinaliza a degradação das ACSs do tipo 2 via proteossoma 26S. As ACS do tipo 2 são as únicas que apresentam o domínio TOE e a região rica em D/E/R, sendo que mutações nessas regiões comprometem a regulação da produção de etileno via degradação dessa ACS (Yoshida *et al.*, 2005).

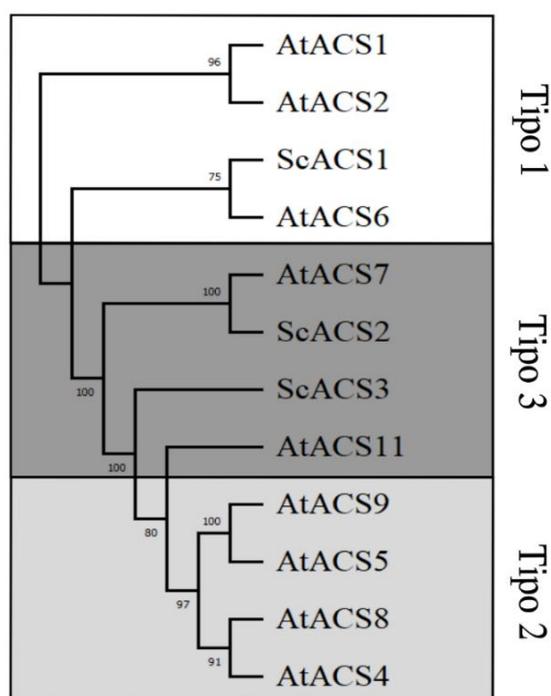


Figura 3: Árvore filogenética comparando ACS de Arabidopsis e cana-de-açúcar. As ACS foram agrupadas em três grupos baseados na regulação pós-transcricional: tipo 1, tipo 2 e tipo 3. Os valores de *bootstrap* estão sendo representado nas ramificações a árvore.

Baseado no comprimento da região terminal e presença da região rica em D/E/R, as ScACS3 e AtACS11 poderiam ser classificadas como tipo 2. No entanto, ambas sequências

apresentam substituições no domínio TOE. Durante a evolução, mutações na região C-terminal da AtACS11 provocaram mudanças do motivo RLSF/RVSW, que são compatíveis com a fosforilação por CDPK em Arabidopsis, para **KLSS**, que não pode ser reconhecido pelas kinases. Por essa razão ela não é regulada da mesma forma que as outras ACSs do tipo 2, sendo classificada como pertencente ao tipo 3 (Yoshida *et al.*, 2005). A ScACS3 possui mudanças ainda mais pronunciadas na região do domínio TOE, de WVFRLSF/WVFRVSW para **WANRLTP**. Esses resultados indicam que, assim como a AtACS11, as mudanças na ScACS3 impedem que ela seja regulada como tipo 2, devendo, portanto, ser classificada como tipo 3. Pouco se sabe sobre a regulação pós-transcricional das ACS do tipo 3, embora alguns estudos mostram que para controlar os níveis de produção de etileno em Arabidopsis, a enzima AtACS7 (tipo 3) pode ser ubiquitinada pela E3 ubiquitina-ligase XB3 e encaminhada para degradação (Lyzenga, Booth e Stone, 2012), ou ainda ter a degradação mediada por resíduos presentes no N-terminal durante a senescência foliar (Sun *et al.*, 2017).

2.3.2 Produção de etileno e expressão das ScACSs

Na primeira avaliação de etileno das plantas transformadas (R0) em cultura de tecido foi considerada a emissão da planta inteira. Para isso as plantas permaneceram em frascos de vidro por 24 h cultivadas em meio Murashige e Skoog (MS) líquido, ao fim desse período o ar do *headspace* foi coletado e analisado por cromatografia gasosa. Dos 30 eventos avaliados 9 tiveram a emissão de etileno estatisticamente menor que o controle (1, 2, 5, 6, 7, 10, 12 e 25), em especial os eventos 1, 2, 7, 12, 24 e 25 que emitiram 46% menos etileno que o controle. Em contrapartida alguns eventos destacaram-se pelo aumento da emissão de (3, 4, 9, 17, 21 e 22). A expressão dos ScACSs nos cinco eventos com menor emissão de etileno foi menor em relação ao controle, porém alguns eventos essa correlação foi inversa. Nos eventos 9 e 22, onde os três genes ScACSs foram silenciadas, houve aumento da produção de etileno (Figura 4). Correlacionando a expressão dos ScACSs e a produção de etileno não fica claro o papel de cada uma na produção de etileno devido à grande variação, com o qual concluímos que os ensaios em planta *in vitro* não são informativos. Ainda assim, foram escolhidos os eventos 1, 2, 7, 12, 13, 14, 15, 24, 25 e 27 para cultivo em casa de vegetação e posterior quantificação de etileno foliar.

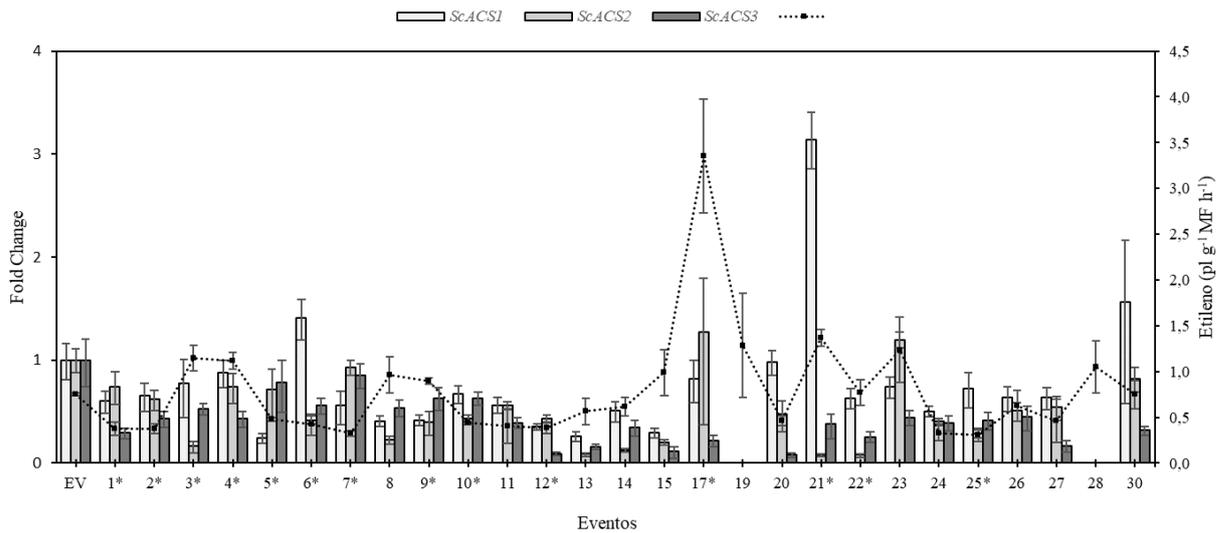


Figura 4: Expressão gênica dos *ScACSs* e produção de etileno *in vitro*. A expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$; barras) e produção de etileno (linha pontilhada) foram comparadas com as plantas transformadas com o vetor pGVG vazio (EV). Eventos marcados com * apresentaram produção de etileno estatisticamente diferente pelo teste t ($p \leq 0,05$; $n = 3$).

A produção de etileno nas plantas adultas foi quantificada através de discos foliares de plantas R0 com 7 meses. Com exceção dos eventos 2 e 27, todos os demais apresentaram produção de etileno menor quando comparado com o controle (Figura 5). Posteriormente, foi avaliado a expressão foliar dos *ScACSs* nos eventos com os menores níveis de produção de etileno (1, 7, 13, 24 e 25). Essa análise mostrou o aumento da expressão do gene *ScACS2*, entre 3 e 7 vezes maior que WT (Figura 5). Enquanto que, *ScACS1* e *ScACS3* tiveram suas expressões reduzidas, em especial no evento 25, onde a redução foi de 23 vezes para *ScACS1* e 29 vezes para o *ScACS3*. Ao fim dessa etapa experimental, foram produzidas a uma nova geração de plantas (S1) usando as gemas laterais das plantas R0. Essas novas plantas foram usadas para os subsequentes ensaios.

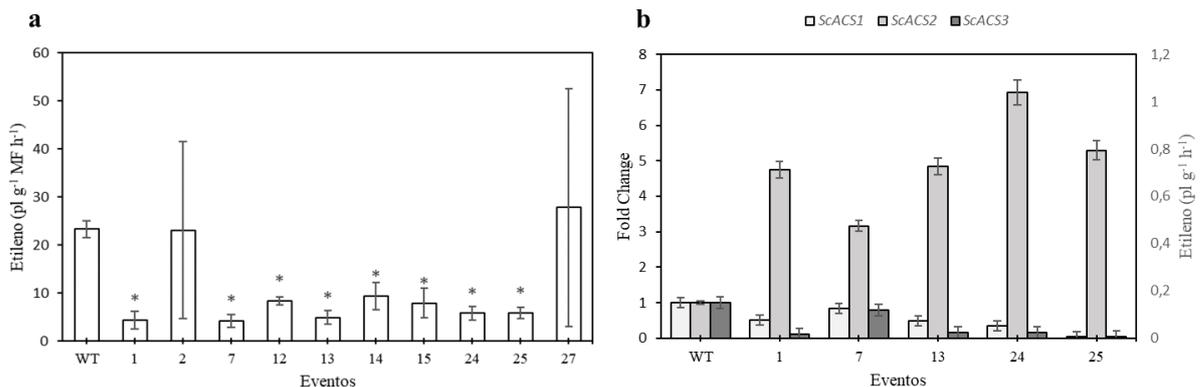


Figura 5: Produção de etileno e expressão das *ScACS*s nas plantas R0 com 7 meses. Eventos marcados com * apresentaram produção de etileno estatisticamente menor pelo teste t (a) ($p \leq 0,05$); expressão gênica dos *ScACS*s (*Fold change*, $2^{-\Delta\Delta CT}$) nas folhas dos 5 eventos com menor produção desse hormônio (b); as barras indicam o desvio padrão das médias ($n=3$).

Para caracterizar o perfil de expressão dos três *ScACS*s das plantas S1, foi usado plantas com 3 meses para as folhas e 6 meses para os colmos (Figura 6). A expressão dos genes *ScACS1* e *ScACS3* nas folhas foi reduzida em todos os cinco eventos quando comparadas com o WT. Contudo, a expressão do *ScACS2* não apresentou diferença significativa em comparação com o WT nos eventos 13, 24 e 25, e apresentou expressão 2,25 e 3 vezes maior nos eventos 1 e 7, respectivamente. Já no colmo, o gene *ScACS1* teve a expressão reduzida em média 2,4 vezes em todos os eventos, com exceção do evento 25. O gene *ScACS2* apresentou a expressão reduzida de cerca de 2 vezes nos eventos 7, 13 e 24 e permaneceu inalterada nos demais eventos, por fim, o *ScACS3* teve a expressão 1,5 menor nos eventos 1 e 24, enquanto que nos demais a expressão foi induzida.

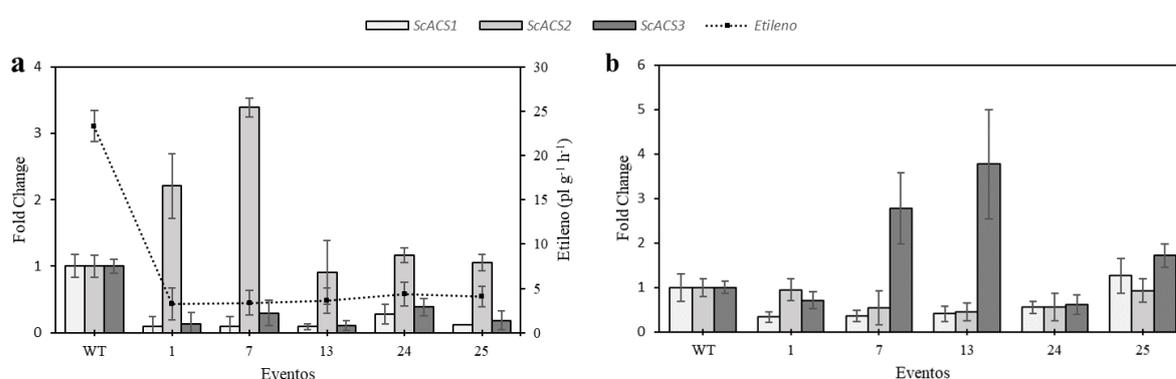


Figura 6: Expressão dos *ScACS*s e produção de etileno foliar nas plantas S1. Expressão gênica (*Fold change*, $2^{-\Delta\Delta CT}$) das folhas (a) de plantas com 3 meses e colmo de plantas com 6 meses (b): As barras indicam o desvio padrão das médias ($n=3$).

Em *Arabidopsis* nem todas as ACSs estão envolvidas na produção de etileno (Tsuchisaka *et al.* 2009), enquanto que em cana-de-açúcar não está clara qual a relação de cada uma das *ScACS*s e a produção de etileno. Alessio (dados não publicados) demonstrou que o *ScACS2* é regulado diferencialmente em relação ao período do dia, tecido e estágio de desenvolvimento. Ademais, a quantidade de transcritos do *ScACS2* é menor nas folhas +1 do que nos colmos imaturos de cana-de-açúcar, sendo que nos colmos maduros sua expressão é maior do que nos imaturos. Alguns estudos têm demonstrado que em *Arabidopsis* as PIFs podem atuar induzindo a expressão de ACSs (Gallego-Bartolome *et al.*, 2012; Khanna *et al.*, 2007; Nomoto *et al.*, 2012), o que poderia ajudar a explicar o aumento da expressão do *ScACS2* nas folhas (Figura 6a) e *ScACS3* nos colmos (Figura 6b), uma vez que a expressão dos *ScPIFs*

também foi aumentada em nossas plantas (ver na seção 2.3.5). Adicionalmente, a expressão dos *ScACSs* pode estar sofrendo influência do *ScERF1*, devido à capacidade dessa classe de FTs de atuar como inibidores da expressão de *ACSs* em *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2011).

Devido à complexa regulação da expressão dos *ACSs*, o motivo do aumento da expressão do *ScACS2* (folhas) e *ScACS3* (colmo) não é claro, visto que, ambos os genes deveriam estar silenciados. Porém, tais resultados podem ser consequência de algum mecanismo compensatório e/ou podem estar sofrendo influência de genes que não foram avaliados, que estariam diferencialmente expressos devido à baixa produção de etileno.

2.3.3 Influência da baixa produção de etileno na expressão do gene *ScACO5*

ACOs são genes responsáveis por codificar a última enzima de biossíntese do etileno, a que converte ACC em etileno (Bleecker e Kende, 2000). Junto com as *ACSs*, as *ACOs* são as principais enzimas relacionadas com a regulação da produção de etileno (Dorling e McManus, 2012). Assim como os genes *ScACSs*, *ScACOs* foram pouco estudados em cana-de-açúcar até o momento. No entanto, quando Cunha *et al.* (2017) avaliaram o transcriptoma de plantas adultas de cana-de-açúcar tratadas com Ethephon (agente que libera etileno intracelularmente) foi observado que *ScACO5* aumenta sua expressão nos colmos e reduz nas folhas. Baseado nisso, *ScACS5* apresenta ser um bom candidato para estudar a influência e da baixa produção de etileno na via de biossíntese do etileno. No presente experimento, a expressão de *ScACO5* apresentou aumento nos dois órgãos avaliados comparativamente ao tipo selvagem, sendo 4 vezes maior nas folhas (Figura 7) e 3 vezes maior no colmo (Figura 8). Já outro gene que codifica ACO (SCEZLR1009E06.g), ainda não caracterizado, teve a expressão reprimida em ambos tecidos. De Paepe *et al.* (2004) descrevem que a aplicação de etileno exógeno pode afetar diferencialmente a expressão dos quatro *ACOs* de *Arabidopsis*, enquanto a mutação *ein2-1* aumenta expressão de apenas um deles, independente da aplicação de etileno. Curiosamente, os baixos níveis de produção de etileno em nossas plantas aumentaram a expressão do *ScACO5* nas folhas, enquanto em Cunha *et al.* (2017), a aplicação de AVG, um inibidor das *ACSs*, reprimiu a expressão do *ScACO5*. Em *Arabidopsis* *ACOs* também podem ter a expressão induzida por *ERFs* (Ruduś, Sasiak e Kepczyński, 2013), permitindo especular que, em nossas plantas silenciadas, o aumento da expressão do *ScERF1* (Figura 7; Figura 8) possa estar induzindo a expressão do gene *ScACO5*. Os mecanismos por trás desse aumento de expressão ainda não estão claros, embora ele possa estar relacionado como uma tentativa de aumentar a eficiência da conversão de ACC em etileno para compensar o silenciamento dos

ScACSs. Porém, estudos futuros são necessários para caracterizar a função das *ScACOs*, visto que a regulação da expressão desses genes, assim como das *ACSs*, é bastante complexa.

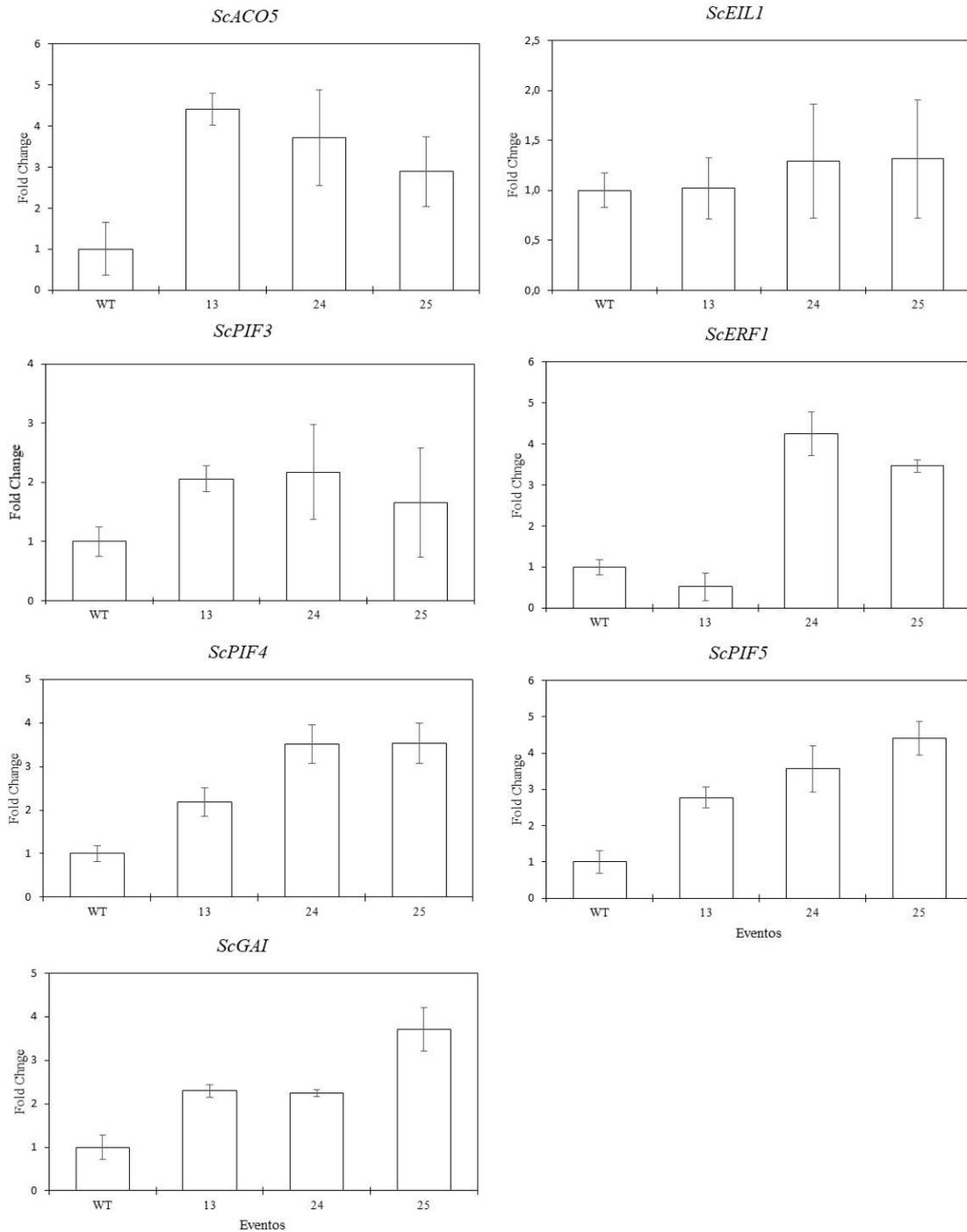


Figura 7: Perfil de expressão dos genes avaliados nas folhas das plantas S1 com 3 meses. Expressão gênica (*Fold change*, $2^{-\Delta\Delta CT}$) dos genes *ScACO5*, *ScEIL1*, *ScERF1*, *ScPIF3*, *ScPIF4*, *ScPIF5* e *ScGAI* nas folhas +1 das plantas com produção reduzida de etileno; as barras indicam o desvio padrão das médias (n=3).

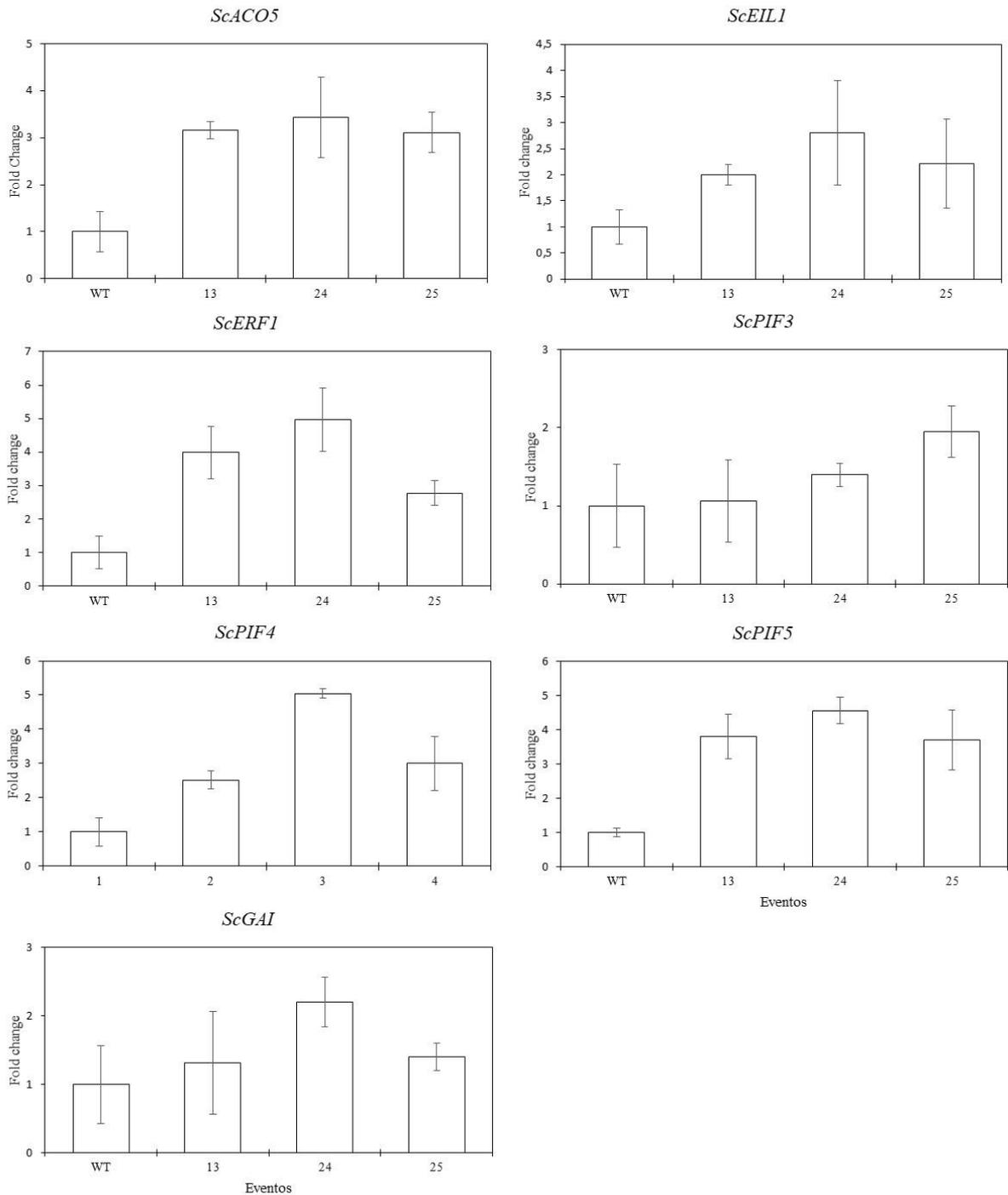


Figura 8: Perfil de expressão dos genes avaliados nos colmos das plantas S1 com 6 meses. Expressão gênica ($Fold\ change, 2^{-\Delta\Delta CT}$) dos genes *ScACO5*, *ScEIL1*, *ScERF1*, *ScPIF3*, *ScPIF4*, *ScPIF5* e *ScGAI* em colmos maduros das plantas com produção reduzida de etileno; as barras indicam o desvio padrão das médias (n=3).

2.3.4 Fatores de transcrição de resposta primária ao etileno têm a expressão induzida pela baixa produção desse hormônio

EIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE 3) é um importante fator de transcrição que inicia uma cascata transcrricional de ativação e repressão de genes de resposta ao etileno (*An et*

al., 2010), tal como os ERFs (Solano *et al.*, 1998). Em *Arabidopsis* o EIN3 tem sua ação correlacionada com seus homólogos, sobretudo com o EIL1 (EIN3-like 1) (Chao *et al.*, 1997). Recentemente nosso grupo identificou que cana-de-açúcar possui 4 homólogos do *ScEIN3* (*ScEIL1*, *ScEIL2*, *ScEIL3* e *SCEIL4*) (Alessio, dados não publicados), e que a aplicação de ethephon pode aumentar expressão do *ScEIL3*, enquanto que a aplicação de AVG inibe a expressão desse gene (Cunha *et al.*, 2017). Em nossas plantas foram avaliadas a expressão do *ScEIL1* (Figura 7; Figura 8) e *ScEIL3* (Figura suplementar 2), sendo que a baixa produção de etileno afetou apenas a expressão do *ScEIL1*, o qual teve a expressão induzida nos colmos.

Fatores de Resposta ao Etileno (ERFs) são uma importante classe de proteínas que possuem o domínio de FT AP2 (APETALA2)/ERF e estão relacionados com a resposta e sinalização ao etileno. A regulação da expressão desses FTs pode ser dependente dos estímulos ambientais, resposta cruzada com outros hormônios (Müller e Munné-Bosch, 2015), tecidos e estágios de desenvolvimento. Cavalcante *et al.* (2007) constataram que a expressão de *ScERF1* e *ScERF2* são induzidas pela aplicação de etileno e que essa indução pode ser potencializada pela aplicação de jasmonato. Em relação a resposta à interação com bactérias e vírus foi observado que a inoculação das plantas de cana-de-açúcar com bactérias fixadoras de nitrogênio por 7 dias reduz a expressão de *SCERF1* e aumentam a expressão de *ScERF2*. Já a infecção pela bactéria patogênica *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e pelo vírus do mosaico da cana-de-açúcar (SCMV) induz a expressão do gene *ScERF1*, enquanto a expressão de *ScERF2* é reprimida após infecção pelo SCMV. Cunha *et al.*, (2017) observaram que a aplicação de Ethephon e AVG (antagonista do etileno) em plantas com 10 meses podem modular de forma complexa a expressão diversos genes da via do etileno, entre os quais os *ERFs*. Essa mudança de expressão pode apresentar diferenças dependendo do tecido avaliado e tempo após a exposição. Em nosso estudo, foi avaliada a expressão gênica do *ScERF1* em folha (3 meses) e colmo (6 meses). Apenas nas folhas do evento 13 houve repressão do gene *ScERF1*, enquanto nos demais eventos a expressão foi aumentada (Figura 7; Figura 8). Esse resultado contrasta com o encontrado por Cunha *et al.* (2017), no qual a expressão desse gene foi reprimida em resposta a aplicação de AVG e induzida pela aplicação de Ethephon. Solano *et al.*, (1998) mostraram que a superexpressão de *ERF1* em *Arabidopsis* provoca o mesmo fenótipo observado em plantas mutantes *crt1* (crescimento reduzido), embora o aumento da expressão de *ScERF1* em nossas plantas não provocou redução do crescimento. Esse resultado pode sugerir que o gene *ScERF1* pode não ter relação com o efeito inibitório do crescimento como visto em *Arabidopsis*, ou que o a indução do crescimento pelo aumento da expressão dos *ScPIFs* esteja se sobressaindo.

Adicionalmente, em *Arabidopsis* a expressão do *ERF1* podem ser induzida pela alta expressão do *EIN3* (Solano *et al.*, 1998), o que poderia ajudar a entender o aumento da expressão do *ScERF1* no colmo. No entanto, a expressão do *ScERF1* também foi aumentada nas folhas sem o aumento da expressão de nenhuma das *ScEILs* avaliadas. O aumento da expressão do *ScERF1* também pode ser consequência de mudança nos níveis hormonais provocada pela baixa produção de etileno, uma vez que os FT *ERFs* podem ter a expressão influenciada por outros hormônios e fatores de transcrição não avaliados (Xie *et al.*, 2019).

O motivo da redução da expressão do *ScERF1* nas folhas do evento 13 não está claro. Porém, pode ser uma particularidade provocada pela inserção do cassete de expressão do RNAi em uma região específica do genoma da cana-de-açúcar. Adicionalmente, a inserção do cassete de expressão pode ter alterado a expressão de genes relacionados com a regulação do gene *ScERF1* nas folhas, provocando a redução do número de transcritos (Filipecki e Malepszy, 2006). Essas especulações também ganham força devido ao baixo desvio padrão observado entre as réplicas biológicas avaliadas, o que mostra que essa resposta é intrínseca desse evento em específico. O papel individual de cada ERF de cana-de-açúcar ainda não foi elucidado, sendo possível que mudanças nos níveis de expressão do *ScERF1* encontrado em nossas plantas possam afetar processos como a resposta a estresses bióticos e abióticos, estabelecimento de processos simbióticos e na resposta conjunta do etileno e outros hormônios vegetais.

2.3.5 Expressão dos *ScPIFs* é induzida pela baixa produção de etileno

Os PIFs são fatores de transcrição que apresentam importante papel na integração de sinais ambientais e sinais internos. Nesse contexto, esses FTs podem atuar como *hubs* das respostas de vários hormônios, como a influência do etileno no crescimento (Leivar e Monte, 2014). Os mecanismos por trás da influência do etileno na expressão dos *PIFs* ainda não foram totalmente desvendados. Estudos em *Arabidopsis* têm demonstrando que a expressão do *PIF3* é aumentada pela aplicação de etileno, o que também ocorre em mutantes *ctr1*, com resposta constitutiva ao etileno. Já em mutantes *ein3 eil1*, insensíveis ao etileno, a expressão desse gene é reduzida (Zhong *et al.*, 2012). Tavares *et al.* (2018) encontraram evidências que a indução do crescimento exercido por *ScPIF3* e *ScPIF4* pode ser bloqueado pela conjugação com a proteína *ScGAI* em cana-de-açúcar (ver seção 2.3.6). Em nossas plantas com baixa produção de etileno, a expressão das três *ScPIFs* avaliadas foi aumentada nas folhas (Figura 7) e colmos (Figura 8), o que pode estar diretamente relacionado com o aumento da estatura das plantas (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros de crescimento das plantas S1 com três meses. Altura das plantas (AP), número de perfilhos (NP), comprimento das folhas (CF), largura das folhas (LF), área foliar (AF). Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t comparando com o WT ($p \leq 0,05$; $n=5$).

Eventos	AP (cm)		NP		LF (cm)		CF (cm)		AF (cm ²)	
WT	16,2	± 1,6	0,0	± 0,0	46,0	± 13,7	1,00	± 0,25	365,25	± 100,77
1	22,4 *	± 0,9	0,4	± 0,5	78,0 *	± 8,3	1,30	± 0,23	1115,7 *	± 324,3
7	21,4 *	± 1,1	2,0 *	± 1,4	60,4	± 4,7	1,28	± 0,08	809,0 *	± 142,0
13	22,9 *	± 3,2	1,8 *	± 1,1	78,4 *	± 9,9	1,56 *	± 0,21	1235,4 *	± 428,5
24	24,3 *	± 0,4	0,6	± 0,9	73,0 *	± 8,2	1,40 *	± 0,10	1129,5 *	± 202,1
25	19,0 *	± 2,1	0,4	± 0,5	66,6 *	± 12,5	1,32	± 0,18	924,5	± 323,5

2.3.6 Expressão do gene *ScGAI* foi induzida sem inibir o crescimento

ScGAI faz parte do grupo de proteínas DELLA, que são amplamente conhecidas como repressoras do crescimento vegetal (Achard, 2003; Sun, 2011). Essa repressão ocorre pelo antagonismo entre etileno e giberelina (Weiss e Ori, 2007), mediado pelas proteínas DELLA. Quando os níveis de etileno são baixos, os níveis GA bioativa são aumentados e interage com o receptor GA-INSENSITIVE DWARF1 (GID1), formando um complexo GA-GID1. Esse complexo por sua vez liga-se às proteínas DELLA, levando essa proteína para degradação via proteossoma 26S, impedindo que as proteínas DELLA inibam o crescimento (Achard e Genschik, 2009). Em cana-de-açúcar foi demonstrado que a superexpressão do *ScGAI* reduz drasticamente o crescimento das plantas, enquanto que o seu silenciamento induz o crescimento (Tavares *et al.*, 2018). Adicionalmente, foi demonstrado que assim como em *Arabidopsis*, na cana-de-açúcar os *ScPIF3* e *ScPIF4* interagem com *ScGAI*, e tal interação pode tornar as PIFs incapazes de se ligarem ao DNA e induzir a expressão de genes do crescimento durante a noite (Tavares *et al.*, 2018). Apesar dos PIFs frequentemente serem relacionados com a indução do crescimento, sabe-se que o homólogo PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR3-LIKE5 (PIL5) pode induzir a expressão de genes que codificam proteínas DELLA em sementes de *Arabidopsis*. Como os estudos com os *ScPIFs* ainda são recentes, as particularidades de cada um ainda são desconhecidas. No entanto, pode-se especular que existam membros da família dos PIFs que induzem a expressão do *ScGAI* e possam ser induzidos pela baixa biossíntese de etileno, como *ScPIF3*, *ScPIF4* e *ScPIF5* foram. Tal cenário poderia ajudar a explicar o aumento da expressão do *ScGAI*. Contrastando com nossos resultados, Cunha *et al.* (2017) observaram que a aplicação de Ethephon pode induzir a expressão do *ScGAI* em cana-de-açúcar. Nossos resultados mostram que a baixa produção de etileno induziu a expressão do *ScGAI* nas folhas (Figura 7) e colmos (Figura 8), mas sem inibição de crescimento. Esse resultado pode ser consequência da degradação da *ScGAI* devido

ao aumento dos níveis de GA em resposta à baixa produção de etileno. No entanto, mais estudos são necessários para entender como a baixa produção de etileno em cana-de-açúcar pode afetar os níveis dos outros hormônios, como GA, bem como a integridade da ScGAI.

2.3.7 Influência do silenciamento dos ACSs no crescimento das plantas.

A aplicação de etileno em cana-de-açúcar pode induzir diversas mudanças no crescimento (Li e Solomon, 2003), embora a influência da baixa produção endógena de etileno durante todo o processo de crescimento ainda é inexplorada até o momento. Para avaliar essa influência foram analisadas plantas S1 dos eventos com menor produção de etileno após 3 (Tabela 1) e 6 meses (Tabela suplementar 4) de cultivo em casa de vegetação. As mudanças mais evidentes nos parâmetros biométricos foram observadas apenas nas plantas S1 com 3 meses, sobretudo no aumento da altura das plantas, comprimento das folhas e área foliar. O aumento da estatura também foi encontrado em mutantes *acs* de *Arabidopsis* com baixa produção de etileno (Tsuchisaka *et al.*, 2009), bem como, aumento da área foliar e comprimento do hipocótilo em mutantes insensíveis ao etileno (Bleecker *et al.*, 1988; Hua *et al.*, 1995). Esses achados indicam que baixa resposta ao etileno está associado com o aumento da estatura das plantas em geral, como discutido anteriormente (ver seção 2.3.7)

2.3.8 A baixa produção de etileno pode reduzir a assimilação de CO₂

O etileno também apresenta importante papel no processo de senescência das plantas, pois o aumento nos níveis desse hormônio pode induzir a degradação da clorofila e abscisão foliar (Gepstein e Thimann, 2008). Já em plantas produzindo pouco etileno o conteúdo de clorofila em folhas maduras e em senescência são maiores, havendo retardo no processo de senescência foliar (Lv *et al.*, 2019). Em cana-de-açúcar o estágio de desenvolvimento foliar pode variar ao longo da folha, onde o terço da base é jovem, o meio é maduro e a ponta é senescente (Mattiello *et al.*, 2015). Em nossas plantas S1 com 3 meses não foi observado mudanças no conteúdo de clorofila do terço médio da folha +1. Adicionalmente, quando comparado o número de folhas verdes das plantas transgênicas (Tabela 1) com o WT, observou-se que a senescência foliar também não foi afetada. Lv *et al.* (2019) encontraram que folhas jovens ou não-senescentes de *Arabidopsis*, não têm a senescência induzida pelo etileno, o que pode ajudar a entender a falta de mudanças nos níveis de clorofila do terço médio das folhas +1 (Figura 9). Portanto, estudar a influência do etileno em folhas de diferentes idades e estágios de desenvolvimento ao longo do limbo foliar pode ajudar a elucidar com maior precisão o papel desse hormônio na senescência da cana-de-açúcar.

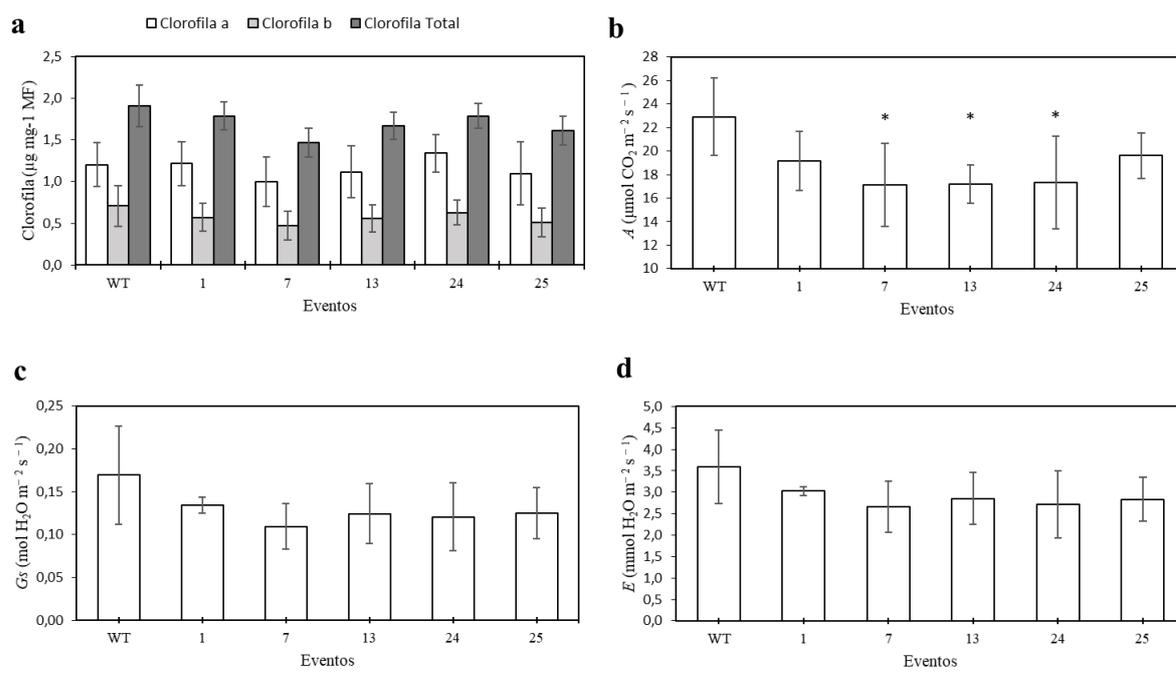


Figura 9: Conteúdo de clorofila (a), assimilação de CO₂ (b), condutância estomática (c) e transpiração (d) das folhas das plantas com baixa produção de etileno S1 com 6 meses. Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t comparando com o WT ($p \leq 0,05$; $n = 5$).

Dentre os parâmetros de trocas gasosas analisados, a assimilação de CO₂ (A) foi o único reduzido pela baixa produção de etileno, mas o mesmo não foi observado com relação à condutância estomática (g_s) e transpiração (E) (Figura 9). Esse resultado está em concordância com o aumento da A em resposta à aplicação de etileno em cana-de-açúcar (Chong *et al.*, 2010; Roberto *et al.*, 2015) e pode indicar a alocação de nitrogênio para maquinaria fotossintética, como visto em mostarda (Khan *et al.*, 2008). Adicionalmente, plantas de tabaco e *Arabidopsis* insensíveis ao etileno apresentam menores níveis de A em decorrência do baixo conteúdo de Rubisco (Tholen *et al.*, 2007; Tholen, Voesenek e Poorter, 2004). Em nossas plantas o conteúdo de clorofila e g_s não foram afetados pela baixa produção de etileno, sendo plausível que a redução da A possa estar relacionada com a redução do conteúdo da Rubisco.

2.3.9 Baixa produção de etileno reduz a velocidade da germinação de gemas laterais

A propagação das plantas de cana-de-açúcar nas áreas de produção é feita utilizando as gemas laterais do colmo. Devido à alta demanda desse tipo de material vegetativo, o entendimento dos processos da germinação é importante para o aumento da produtividade da cultura. Nossos resultados mostram que a germinação das gemas transgênicas dos cinco eventos que produzem menor quantidade de etileno foi bem mais lenta que o WT (Figura 10). Embora

essa diferença seja reduzida até o fim do experimento, 3 eventos ainda tiveram taxa de germinação menor, em especial o evento 7. A influência negativa do etileno na taxa de germinação de sementes de *Arabidopsis* foi demonstrado usando mutantes *etr*, que são insensíveis ao etileno (Bleecker *et al.*, 1988). O mesmo efeito foi observado nas gemas laterais após aplicação de AVG e no mutante *etr* (Chatfield *et al.*, 2000). Alguns estudos identificaram que proteínas DELLA são importantes inibidores da germinação de sementes de *Arabidopsis* (Achard e Genschik, 2009; Lee *et al.*, 2002; Tyler *et al.*, 2015). O controle da germinação pela luz é mediado pelo PIL5/PIF1, cuja degradação é inibida no escuro, o que induz a biossíntese de duas proteínas DELLA (GAI e RGA) (Oh *et al.*, 2007) e ácido abscísico, reprimindo a biossíntese de GA (Gabriele *et al.*, 2010). Esse conjunto de condições resulta na repressão da germinação. Em nossas plantas aumento da expressão de *ScGAI* pode estar atuando como inibidor da germinação através do bloqueio da expressão de genes indutores da germinação.

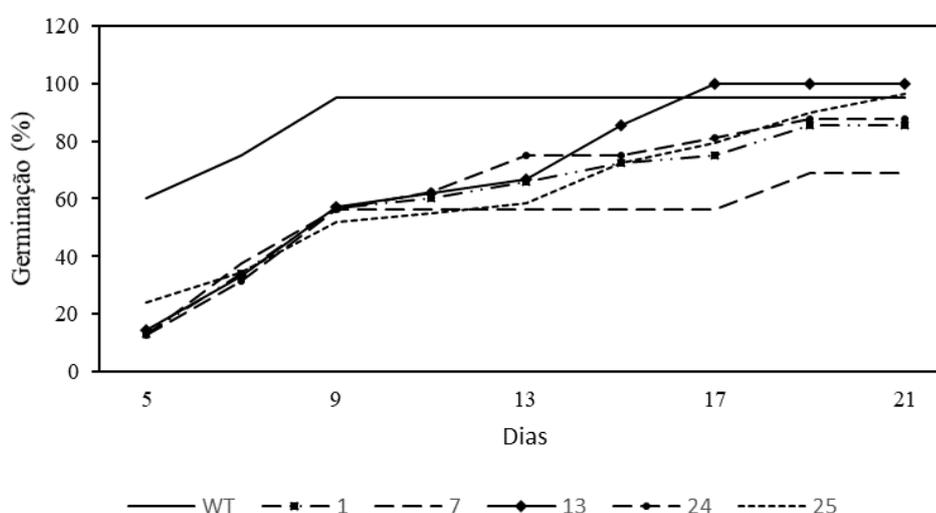


Figura 10: Taxa de germinação das gemas laterais das plantas S1 com 8 meses.

2.3.10 Conteúdo de sacarose

O etileno influencia a maturação da cana-de-açúcar devido às mudanças na atividade de enzimas envolvidas do processo. Foi reportado que o conteúdo de sacarose nos colmos pode ser aumentado pela aplicação de Ethephon e reduzido pela aplicação de AVG (Cunha *et al.*, 2017). Nossas plantas maduras não apresentaram mudanças no conteúdo de sacarose no colmo (Tabela 2), mostrando que a baixa produção de etileno não influencia no quanto de sacarose pode ser estocado pelas plantas. Contudo, é importante ressaltar que nossas plantas foram cultivadas em vasos e em casa de vegetação, essas podem ter interferido negativamente em como elas responderam ao longo do processo de maturação. Para superar

essas limitações, estudos de campo acompanhando a maturação ao longo do tempo podem ajudar a entender com mais precisão o efeito dos baixos níveis de etileno endógeno na maturação.

Tabela 2: Brix° de três pontos do colmo de plantas S1 com 6 meses. O Brix° pode ser interpretado como sendo a porcentagem de sacarose no caldo coletado. IM (índice de maturação) mostra o estágio de maturação em que as plantas se encontram: menor que 0,60 = verde, entre 0,60 e 0,85 = em maturação, entre 0,85 e 1 = madura e maior que 1 = consumo da sacarose. Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t comparando com o WT. ($p \leq 0,05$; $n=5$).

Eventos	Brix°									
	Base			Meio			Ápice			IM
WT	21,2	±	1,61	20,3	±	1,46	19,58	±	1,53	0,93 ± 0,04
1	21,5	±	0,51	21,2	±	0,77	20,4	±	0,48	0,95 ± 0,02
7	21,6	±	0,53	20,7	±	0,72	20,54	±	0,19	0,95 ± 0,02
13	21,7	±	0,19	20,8	±	0,72	20,56	±	0,66	0,95 ± 0,03
24	21,2	±	0,63	20,5	±	1,41	19,44	±	3,00	0,91 ± 0,13
25	21,8	±	0,68	20,9	±	1,40	19,28	±	3,72	0,88 ± 0,17

2.3.11 O aparato antioxidante não-enzimático é induzido pela redução nos níveis de etileno

Diversos estresses de origem biótica e abiótica podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mittler *et al.*, 2004), que podem provocar estresse oxidativo, degradação de membranas, danos ao DNA e desnaturação proteica (Gill e Tuteja, 2010). Em condições estressantes as plantas costumam produzir mais etileno o que desencadeia uma cadeia de respostas que pode envolver a produção de componentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Dubois, Broeck, Van den e Inzé, 2018, Das e Roychoudhury, 2014). Os ensaios de potencial antioxidante do extrato foliar (Figura 11) mostram que a captura de radicais livres (%DPPH) foi aumentada nos eventos 1, 13 e 24, bem como o poder redutor (FRAP) nos eventos 1, 24 e 25. Já o conteúdo de fenóis, componentes antioxidantes não-enzimáticos, foi maior em todos os eventos avaliados, com exceção ao 7. Esse perfil de resposta geralmente é induzido pelo etileno, porém, alguns estudos têm observado que mesmo plantas

insensíveis ao etileno podem investir no sistema antioxidante quando submetidas a condições estressantes. Wang et al. (2016) encontraram que mutantes de tabaco insensíveis ao etileno apresentam maior taxa de sobrevivência e investimento no aparato antioxidante quando submetidas a estresse hídrico, porém nenhuma mudança é observada entre os mutantes e WT em condições não estressantes. Em *Arabidopsis*, tem sido demonstrado que mutantes insensíveis ao etileno *ein2-5* e *ein3-1* são mais susceptíveis ao estresse salino (Asensi-Fabado et al., 2012; Yang, Zu e Tang, 2013). Adicionalmente, Cui et al., (2015) observaram que os mutantes *ein2-5* e *ein3-1* também são mais sensíveis ao estresse hídrico, e compensam essa deficiência aumentando de atividade e enzimas antioxidantes. O mutante *ein2-1* se sobressai ao estresse induzido pelo NO₂ devido ao alto investimento no sistema antioxidante e expressão de genes correlatos (Liu et al., 2020). Asensi-Fabado et al. (2012) encontraram os mutantes *ein3-1* de *Arabidopsis* submetidos a estresse salino contornam a falta de sinalização feita pelo etileno, mudando os níveis de outros hormônios que ativam o sistema de proteção. Cunha et al. (2017) observaram que aplicação de Ethephon e AVG podem alterar os níveis e expressão da via de outros hormônios, bem como a expressão de genes relacionados a tolerância a estresses. Em nossas plantas produzindo pouco etileno, mesmo sem a indução a condições estressantes houve investimento no sistema antioxidante, o que contrasta com o observado em mutantes insensíveis sob condições ótimas de cultivo. Esses perfil encontrado pode relacionar-se com o aumento de expressão do *ScGAI* e do *ScERF1*, já que proteínas DELLA (Achard et al., 2006, 2008) e ERFs (Wang et al., 2016) atuam como reguladores dos níveis de ROS através do controle da expressão de enzimas antioxidantes. Além disso, as respostas encontradas podem estar sendo induzidas por outros hormônios na tentativa compensar a baixa produção de etileno. O aumento dos níveis de substâncias antioxidantes em nossas plantas pode indicar maior eficiência na resposta a estresses, no entanto, também pode indicar maior suscetibilidade aos danos causados por estresse oxidativo.

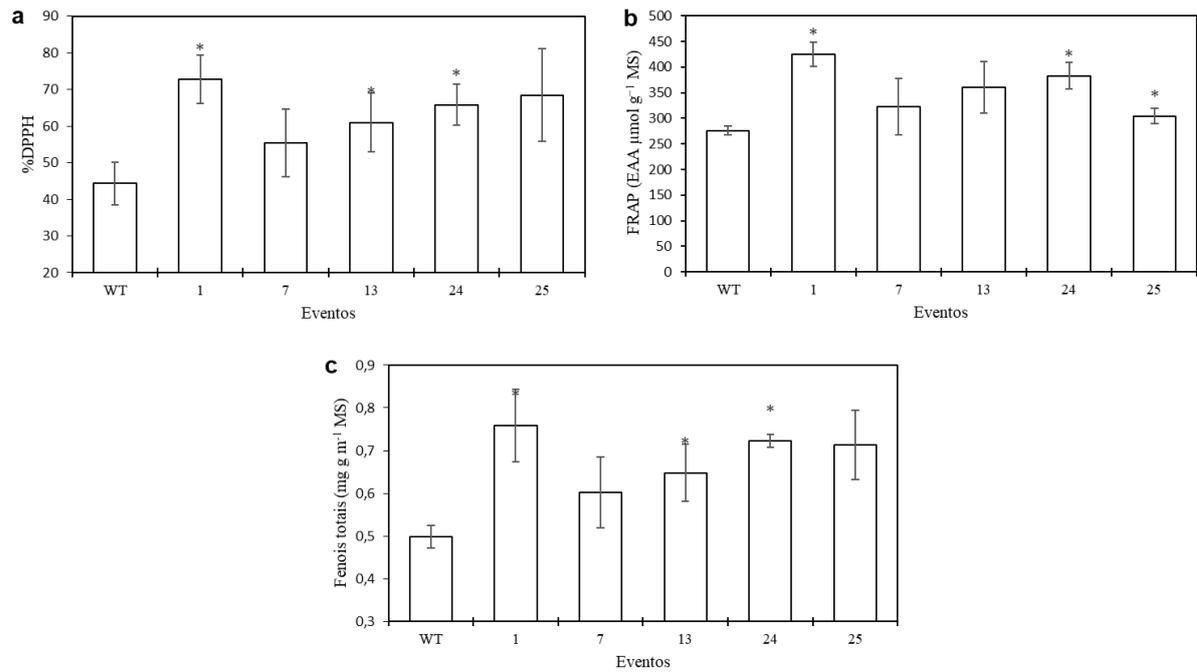


Figura 11: Análise do potencial antioxidante não-enzimático do extrato foliar de plantas S1 com 3 meses. Taxa de captura de radicais livres (%DPPH), poder redutor dos íons ferro (FRAP) representado pelo equivalente de ácido ascórbico (EAA) e conteúdo de fenóis. Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t ($p \leq 0,05$; $n = 3$).

2.4 Considerações finais

Neste trabalho demonstramos pela primeira vez como a redução da produção de etileno pode afetar o crescimento, genes relacionados com crescimento e reposta ao etileno, a fotossíntese e o aparato antioxidante não-enzimático. Muitas das respostas encontradas neste estudo, como a indução da expressão do *ScACO5*, dos FTs da via do etileno e da *ScGAI*, assim como o aumento o potencial antioxidante das plantas frequentemente são descritas como sendo induzidas pelo etileno ou em mutantes de reposta constitutiva a desse hormônio. Em contrapartida o fenótipo encontrado, o aumento da expressão das *ScPIFs* e redução da fotossíntese estão de acordo com o observado em outras espécies. Alguns resultados que divergem do observado em outras espécies podem estar relacionados com particularidades da cana-de-açúcar e do genótipo usado. Além disso, o número de genes avaliados não é suficiente para generalizar o comportamento de famílias gênicas grandes como dos ERFs e ACOs, portanto estudos mais abrangentes são necessários.

Esses achados demonstram que a influência e papel do etileno em cana-de-açúcar é muito complexo e chama atenção para a importância de se estudar sistematicamente a via desse hormônio. Para o futuro, será de grande interessante entender como a baixa produção de etileno pode afetar as vias dos demais hormônios vegetais e as implicações disso no desenvolvimento e fisiologia das plantas. Adicionalmente, avaliar as plantas em situação de campo pode ajudar a discriminar as interferências impostas pelo cultivo em casa de vegetação.

3 CONCLUSÕES GERAIS

O hormônio etileno regula diversos processos ao longo do desenvolvimento vegetal. Em plantas modelo, esses processos e mecanismos moleculares são bem elucidados, no entanto em cana-de-açúcar, estudos da influência do etileno e da sua via foi pouco explorada.

Neste trabalho, foi possível identificar que a ScACS3 é agrupada filogeneticamente com as ACSs do tipo 2. Porém, modificações na região C-terminal indicam que sua regulação seja como as do tipo 3.

Além disso, foi possível concluir que a baixa produção de etileno nem sempre está relacionado com o silenciamento simultâneo dos três genes que codificam ScACSs, indicando uma regulação complexa que demanda estudos mais aprofundados.

Nas folhas e colmos, a baixa produção de etileno causou aumento da expressão do fator de transcrição primário *ScERF1*, de *ScACO5*, do gene da proteína inibitória do crescimento ScGAI e de três genes *ScPIF*.

Adicionalmente, a baixa produção de etileno também induz uma ampla gama de alterações fisiológicas e no desenvolvimento, como a biossíntese de compostos do sistema antioxidante não-enzimático nas folhas e o aumento no crescimento das plantas, reduz e velocidade da germinação de gemas laterais e assimilação de CO₂, porém, não altera o processo de senescência das folhas (Figura 12).

A cana-de-açúcar apresenta respostas contrastantes à observada em espécies modelo com baixa produção de etileno ou mutantes insensíveis ao etileno, como por exemplo o aumento da expressão do gene *GAI* e de fatores de transcrição primários da via do etileno junto com indução do crescimento, indução do sistema antioxidante não-enzimático e ausência de mudanças na senescência das folhas.

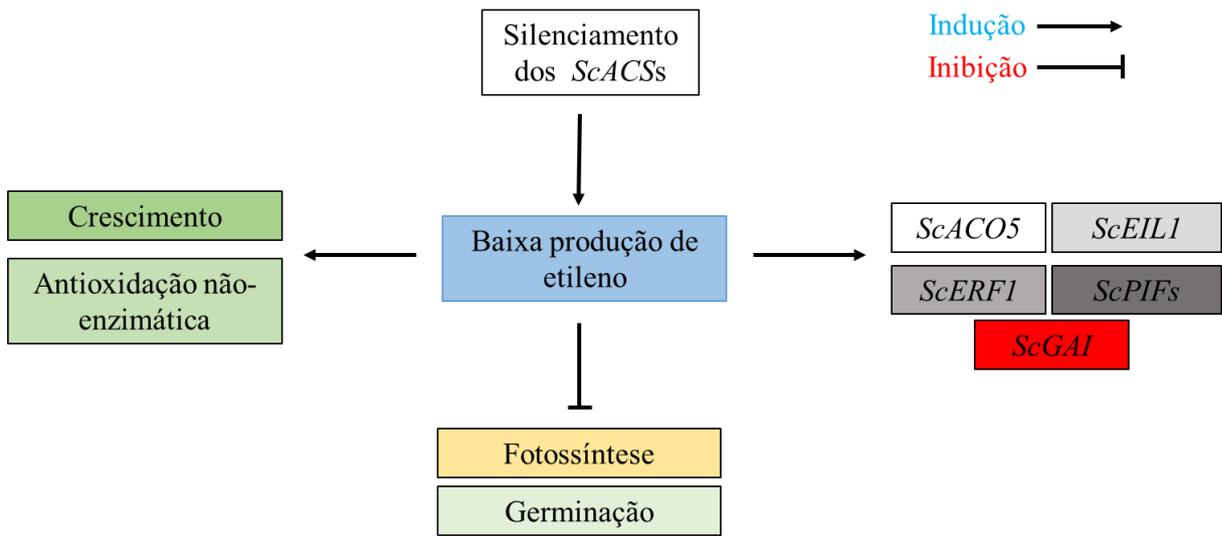


Figura 12: Principais respostas provocadas pela baixa produção de etileno no presente estudo.

4 REFERÊNCIAS

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. J. **Ethylene in Plant Biology**. [s.l: s.n.].
- ACHARD, P. Ethylene Regulates Arabidopsis Development via the Modulation of DELLA Protein Growth Repressor Function. **the Plant Cell Online**, v. 15, n. 12, p. 2816–2825, 2003.
- ACHARD, P. *et al.* Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. **Science**, 2006.
- _____. Plant DELLAs Restrain Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species. **Current Biology**, v. 18, n. 9, p. 656–660, maio 2008.
- ACHARD, P.; GENSHIK, P. Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown della proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 4, p. 1085–1092, 2009.
- ADAM, M. *et al.* Extraction of antioxidants from plants using ultrasonic methods and their antioxidant capacity. **Journal of Separation Science**, 2009.
- AN, F. *et al.* Ethylene-Induced Stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 Is Mediated by Proteasomal Degradation of EIN3 Binding F-Box 1 and 2 That Requires EIN2 in Arabidopsis. **the Plant Cell Online**, v. 22, n. 7, p. 2384–2401, 2010.
- AN, F. *et al.* Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated Arabidopsis seedlings. **Cell Research**, v. 22, n. 5, p. 915–927, 2012.
- ARNON, D. I. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. **Plant physiology**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1949.
- ASENSI-FABADO, M. A. *et al.* Enhanced oxidative stress in the ethylene-insensitive (ein3-1) mutant of Arabidopsis thaliana exposed to salt stress. **Journal of Plant Physiology**, 2012.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 1996.
- BERNARDO, R. *et al.* Analysis of the agricultural productivity of the sugarcane crop in regions of new agricultural expansions of sugarcane. **Gestao e Producao**, 2019.
- BLEECKER, A. B. *et al.* Insensitivity to Ethylene Conferred by a Dominant Mutation in Arabidopsis thaliana. **Science**, v. 241, n. 4869, p. 1086–1089, 26 ago. 1988.
- BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity** *LWT - Food Science and Technology*, 1995.

BULL, T. A.; GLASZIOUT, K. T. The evolutionary significance of sugar accumulation in *Saccharum*. *Australian Journal of Biological Sciences*, v. 16, n. 4, p. 737–742, 1963.

BUSTIN, S.; HUGGETT, J. **qPCR primer design revisited** *Biomolecular Detection and Quantification*, 2017.

CASTILLON, A.; SHEN, H.; HUQ, E. **Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks** *Trends in Plant Science*, 2007.

CAVALCANTE, J. J. V. *et al.* Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, n. 3, p. 673–686, 2007.

CHANG, C.; SCHALLER, G. E.; RESNICK, J. S. Ethylene. *eLS*, n. June, 2013.

CHAO, Q. *et al.* Activation of the ethylene gas response pathway in arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, v. 89, n. 7, p. 1133–1144, 1997.

CHATFIELD, S. P. *et al.* The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 2000.

CHONG, B. F. *et al.* Early exposure to ethylene modifies shoot development and increases sucrose accumulation rate in sugarcane. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 29, n. 2, p. 149–163, 2010.

CONAB. Monitoramento agrícola – Cana-de-açúcar. v. 18, n. 1, 2017.

CUI, M. *et al.* Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, 2015.

CUNHA, C. P. *et al.* Ethylene-induced transcriptional and hormonal responses at the onset of sugarcane ripening. *Scientific Reports*, v. 7, n. October 2016, p. 1–18, 2017.

D'HONT, A. *et al.* Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics*, 1996.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, n. DEC, p. 1–13, 2014.

DIAS, M. O. S. *et al.* Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8964–8971, 2011.

DORLING, S. J.; MCMANUS, M. T. The Fate of ACC in Higher Plants. *In: The Plant Hormone Ethylene*. [s.l: s.n.]. v. 44p. 83–115.

FAOSTAT. **Statistics of the Food and Agriculture Organization of the United Nations**. [s.l: s.n.].

FENG, S. *et al.* Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 475–479, 2008.

FERRARO, D. O.; RIVERO, D. E.; GHERSA, C. M. An analysis of the factors that influence sugarcane yield in Northern Argentina using classification and regression trees. **Field Crops Research**, v. 112, n. 2–3, p. 149–157, 2009.

FILIPECKI, M.; MALEPSZY, S. Unintended consequences of plant transformation: A molecular insight. **Journal of Applied Genetics**, v. 47, n. 4, p. 277–286, dez. 2006.

GABRIELE, S. *et al.* The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene AtGA3ox1. **Plant Journal**, 2010.

GALLEGO-BARTOLOME, J. *et al.* Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 33, p. 13446–13451, 2012.

GEPSTEIN, S.; THIMANN, K. V. The Role of Ethylene in the Senescence of Oat Leaves. **PLANT PHYSIOLOGY**, 2008.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. **Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants** *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010.

GUIDELLI, G. *et al.* **pGVG: a new Gateway-compatible vector for transformation of sugarcane and other monocot crops**. [s.l: s.n.].

GUZMAN, P. Exploiting the Triple Response of *Arabidopsis* To Identify Ethylene-Related Mutants. **THE PLANT CELL ONLINE**, 1990.

- GUZMÁN, P.; ECKER, J. R. Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. **The Plant Cell**, v. 2, n. 6, p. 513–523, jun. 1990.
- HARPAZ-SAAD, S. *et al.* The Formation of ACC and Competition Between Polyamines and Ethylene for SAM. **The Plant Hormone Ethylene**, v. 44, p. 53–81, 2012.
- HERMANN, E. R.; CÂMARA, G. M. S. Um Método Simples para Estimar a Área Foliar da Cana-de-Açúcar. **STAB**, v. 17, n. 5, p. 32–34, 1999.
- HUA, J. *et al.* Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis EPS gene. **Science**, v. 269, n. 5231, p. 1712–1714, 1995.
- JAIN, R. *et al.* Influence of bud sett soaking with ethephon and its foliar application on growth, biochemical attributes and gene expression in sugarcane. **Journal of Environmental Biology**, v. 39, n. 4, p. 472–480, 1 jul. 2018.
- JANSSEN, R.; RUTZ, D. D. Sustainability of biofuels in Latin America: Risks and opportunities. **Energy Policy**, v. 39, n. 10, p. 5717–5725, 2011.
- KHAN, N. A. *et al.* The application of ethephon (an ethylene releaser) increases growth, photosynthesis and nitrogen accumulation in mustard (*Brassica juncea* L.) under high nitrogen levels. **Plant Biology**, v. 10, n. 5, p. 534–538, 2008.
- KHANNA, R. *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor PIF5 acts on ethylene biosynthesis and phytochrome signaling by distinct mechanisms. **Plant Cell**, 2007.
- KIEBER, J. J. *et al.* CTRI , a Negative Regulator of the Ethylene Pathway in Arabidopsis, Encodes a Member of the Raf Family of Protein Kinases. **Cell**, v. 72, n. 3, p. 427–441, 1993.
- KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, 2018.
- LANAHAN, M. B. *et al.* The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. **The Plant Cell**, v. 6, n. 4, p. 521–530, abr. 1994.
- LARKIN, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 2007.
- LEE, S. *et al.* Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. **Genes and Development**, 2002.
- LEIVAR, P.; MONTE, E. PIFs: Systems Integrators in Plant Development. **The Plant Cell**, v. 26, n. 1, p. 56–78, 2014.

- LI, Y.; SOLOMON, S. Ethephon: A versatile growth regulator for sugar cane industry. **Sugar Tech**, v. 5, n. 4, p. 213–223, 2003.
- LI, Z. *et al.* The ethylene response factor AtERF11 that is transcriptionally modulated by the bZIP transcription factor HY5 is a crucial repressor for ethylene biosynthesis in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 68, n. 1, p. 88–99, 2011.
- LIANG, X. *et al.* Characterization of two members (ACS1 and ACS3) of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of Arabidopsis thaliana. **Gene**, v. 167, n. 1–2, p. 17–24, 1995.
- LIN, Z. *et al.* A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. **Plant Journal**, v. 55, n. 2, p. 301–310, 2008.
- LIU, C. *et al.* Ethylene insensitive mutation improves Arabidopsis plant tolerance to NO₂ exposure. **Ecotoxicology and environmental safety**, 2020.
- LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 163, n. 1, p. 16–20, maio 1987.
- LUCAS, M. DE *et al.* A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 480–484, 2008.
- LV, S. F. *et al.* The dependence of leaf senescence on the balance between 1-aminocyclopropane-1-carboxylate acid synthase 1 (ACS1)-catalysed ACC generation and nitric oxide-associated 1 (NOS1)-dependent NO accumulation in Arabidopsis. **Plant Biology**, v. 1, p. 1–9, 2019.
- LYZENGA, W. J.; BOOTH, J. K.; STONE, S. L. The Arabidopsis RING-type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7. **Plant Journal**, 2012.
- MAREUIL, F.; DOPPELT-AZEROUAL, O.; MÉNAGER, H. A public Galaxy platform at Pasteur used as an execution engine for web services. 2017.
- MATTIELLO, L. *et al.* Physiological and transcriptional analyses of developmental stages along sugarcane leaf. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–21, 2015.
- MCCARTHY, D. L. *et al.* Glutamate 47 in 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase is a major specificity determinant. **Biochemistry**, 2001.

MCCORMICK, A. J.; CRAMER, M. D.; WATT, D. A. Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. **New Phytologist**, v. 171, n. 4, p. 759–770, set. 2006.

MCKEON, T. A.; FERNÁNDEZ-MACULET, J. C.; YANG, S.-F. Biosynthesis and Metabolism of Ethylene. *In*: DAVIES, P. J. (Ed.). . **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1995. p. 118–139.

MITTLER, R. *et al.* **Reactive oxygen gene network of plants** **Trends in Plant Science**, 2004.

MOORE, P. Temporal and Spatial Regulation of Sucrose Accumulation in the Sugarcane Stem. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 4, p. 661, 1995.

MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 32–41, 2015.

NOMOTO, Y. *et al.* Circadian clock-and PIF4-controlled plant growth: A coincidence mechanism directly integrates a hormone signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 11, p. 1950–1964, 2012.

OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027**. [s.l.] OECD, 2018.

OH, E. *et al.* PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. **Plant Cell**, 2007.

PAEPE, A. DE *et al.* Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 39, n. 4, p. 537–559, 2004.

PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; D'HONT, A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**, 2010.

POEL, B. VAN DE; SMET, D.; STRAETEN, D. VAN DER. Ethylene and Hormonal Cross Talk in Vegetative Growth and Development. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 61–72, 2015.

POEL, B. VAN DE; STRAETEN, D. VAN DER. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. November, p. 1–11, 2014.

RIAÑO-PACHÓN, D. M.; MATTIELLO, L. Draft genome sequencing of the sugarcane hybrid SP80-3280. **F1000Research**, v. 6, p. 861, 2017.

ROBERTO, G. G. *et al.* Variação da fotossíntese e dos teores de carboidratos induzidos por etefom e déficit hídrico na fase de maturação da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 74, n. 4, p. 379–386, 2015.

ROMAN, G. *et al.* Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: Five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. **Genetics**, 1995.

SEBASTIÀ, C. H. *et al.* Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2004.

SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. *In*: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E. ET. AL. (Ed.). . **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. 1. ed. Piracicaba: Livrocere, 2006. p. 19–36.

SILVA, M. DE A.; CAPUTO, M. M. C. Ripening and the Use of Ripeners for Better Sugarcane Management. *In*: **Crop Management - Cases and Tools for Higher Yield and Sustainability**. [s.l.] InTech, 2012. .

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. **American journal of enology and viniculture**, 1965.

SOLANO, R. *et al.* Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. **Genes & Development**, v. 12, n. 23, p. 3703–3714, 1 dez. 1998.

SOUZA DIAS, M. O. DE *et al.* Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015.

SREENIVASAN, T. V.; AHLOOWALIA, B. S.; HEINZ, D. J. Cytogenetics. *In*: HEINZ, D. J. (Ed.). . **Sugarcane improvement through breeding**. [s.l: s.n.]. p. 211–253.

SUN, G. *et al.* N-terminus-mediated degradation of ACS7 is negatively regulated by senescence signaling to allow optimal ethylene production during leaf development in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, 2017.

SUN, T. P. The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling

- module in plants. **Current Biology**, v. 21, n. 9, p. 338–345, 2011.
- TAVARES, R. *et al.* ScGAI is a key regulator of culm development in sugarcane. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 16, p. 3823–3837, 2018.
- TAVARES, R. G. **ACC SINTASE EM CANA DE AÇÚCAR: ESTUDOS DE REGULAÇÃO GÊNICA E APLICAÇÃO**. [s.l.] UNICAMP, 2011.
- THOLEN, D. *et al.* Ethylene Insensitivity Results in Down-Regulation of Rubisco Expression and Photosynthetic Capacity in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 1305–1315, 2007.
- THOLEN, D.; VOESENEK, L. A. C. J.; POORTER, H. Ethylene Insensitivity Does Not Increase Leaf Area or Relative Growth Rate in Arabidopsis, Nicotiana tabacum, and Petunia x hybrida . **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p. 1803–1812, 2004.
- TSIROPOULOS, I. *et al.* Life cycle impact assessment of bio-based plastics from sugarcane ethanol. **Journal of Cleaner Production**, 2015.
- TSUCHISAKA, A. *et al.* A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in Arabidopsis thaliana. **Genetics**, v. 183, n. 3, p. 979–1003, 2009.
- TYLER, L. *et al.* DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis [wI. v. 135, n. 2, p. 1008–1019, 2015.
- VARGAS MORES, G. DE *et al.* Sustainability and innovation in the Brazilian supply chain of green plastic. **Journal of Cleaner Production**, 2018.
- WACLAWOVSKY, A. J. *et al.* Sugarcane for bioenergy production: An assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 3, p. 263–276, 2010.
- WANG, H. *et al.* Ethylene-insensitive mutants of Nicotiana tabacum exhibit drought stress resistance. **Plant Growth Regulation**, v. 79, n. 1, p. 107–117, 2016.
- WEISS, D.; ORI, N. Mechanisms of Cross Talk between Gibberellin and Other Hormones. **Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 1240–1246, 2007.
- WELBAUM, G. E.; MEINZER, F. C. Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. **Plant physiology**, v. 93, n. 3, p. 1147–1153, 1990.
- WU, K. *et al.* Effects of spraying ethephon on the canopy structure and the physiological indexes for drought resistance in sugarcane. **Southwest China Journal of Agricultural**

Sciences, 2004.

XIE, Z. *et al.* AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. February, p. 1–17, 2019.

YAMAGAMI, T. *et al.* Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 49, p. 49102–49112, 2003.

YANG, L.; ZU, Y. G.; TANG, Z. H. Ethylene improves Arabidopsis salt tolerance mainly via retaining K⁺ in shoots and roots rather than decreasing tissue Na⁺ content. **Environmental and Experimental Botany**, 2013.

YIN, X. R. *et al.* Involvement of an ethylene response factor in chlorophyll degradation during citrus fruit degreening. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 86, n. 5, p. 403–412, 2016.

YOSHIDA, H. *et al.* Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. **BMC Plant Biology**, v. 5, p. 1–13, 2005.

ZHONG, S. *et al.* A molecular framework of light-controlled phytohormone action in arabidopsis. **Current Biology**, v. 22, n. 16, p. 1530–1535, 2012.

5 APÊNDICES

Tabela suplementar 1: Lista de genes e primers usados para qPCR. Os primers para as três ACSs foram desenhados por Dr. Lucia Mattiello em seu pos-doc, (FAPESP 2015/23789-4), o primers para a *ScGAI* desenhados por Tavares *et al.*, (2018), os primer marcados com * foram obtidos em Cunha *et al.* (2017) e o marcados com ** foram desenhados usando Primer-BLAST, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Gene	Primer forward (5' > 3')	Primer reverse (5' > 3')
<i>ScACS1</i>	CGTACAGCCTCTCCAAGGAC	GAGAGCATCTTCGCCAGGAA
<i>ScACS2</i>	TCAGGGTGTGCTTCGCTAAC	TGCTGCGTCGATACTGTTGT
<i>ScACS3</i>	AGAAGGTGGTGTTCGAGGTC	GGACATGTTGGCGAAGCAGA
<i>ScACO5*</i>	GCCAAGCAGAAGTTCCAG	TCCGTACTAGCAAGTTTTAAGC
<i>ScERF1*</i>	GAAGGGAGAAGGCGGTTT	GCGTAGTACAGGGCAGTA
<i>ScEIL3*</i>	CCTGATTTGGCTGGGAGTTCT	GTCCACTGGCATACTGCTCTG
<i>ScEIL1*</i>	GCTGGAACTTGGAAGTGGTTTA	CATACAGAAACAAGCACAAGCA
<i>ScGAI</i>	CCAAGGACAAGATGATGGTG	GACGAACGCACCTTGTACC
<i>ScPIF3**</i>	CCTCTTCGGCGACTTCTCTC	CTTCGACGATGGGGTAGTGG
<i>ScPIF4**</i>	TTCATGCCACCAATGGCTCT	GGGATATGAGTTGGCAGGGG
<i>ScPIF5**</i>	CCACCACCATACACGGTTCA	AGGCTTGCCACAATTCTCGT
<i>ScPUB*</i>	CCGGTCCTTTAAACCAACTCAG T	CCCTCTGGTGTACCTCCATTTG

Tabela suplementar 2: Parâmetros biométricos das plantas R0 com 7 meses. Altura das plantas (AP), diâmetro do colmo (DC), número de nós (NN), número de perfilhos (NP), número de folhas (NF), comprimento das folhas (CF), largura das folhas (LF) e área foliar (AF). Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t ($p \leq 0,05$; $n=3$).

Eventos	AP (cm)		DC (mm)		NN		NP		NF		CF (cm)		LF (cm)		AF (cm ²)	
WT	72,0	± 26,5	11,6	± 1,4	8,7	± 2,3	5,0	± 1,0	5,33	± 1,2	74,3	± 5,1	1,67	± 0,29	518,9	± 121,8
1	59,7	± 29,3	8,2 *	± 1,3	8,7	± 0,6	4,0	± 1,0	3,33	± 1,2	70,0	± 7,9	1,60	± 0,36	541,5	± 177,2
7	89,3	± 9,3	10,4	± 1,2	12,0	± 1,7	7,7 *	± 1,2	5,33	± 1,5	74,3	± 7,2	1,50	± 0,20	708,9	± 26,5
13	79,0	± 12,2	9,6	± 1,3	12,0	± 1,0	5,0	± 1,0	4,33	± 0,6	73,3	± 7,0	1,43	± 0,12	496,7	± 44,8
24	89,0	± 12,8	10,9	± 2,6	14,3 *	± 0,6	5,7	± 2,1	7,00	± 1,0	82,3	± 1,5	1,63	± 0,25	852,5 *	± 42,5
25	90,3	± 22,4	11,9	± 0,6	11,0	± 2,6	6,3	± 0,6	7,00	± 1,0	96,3 *	± 7,8	1,90	± 0,00	1237,4 *	± 183,1

Tabela suplementar 3: Parâmetros biométricos das plantas R0 com 12 meses. Altura das plantas (AP), diâmetro do colmo (DC), número de nós (NN), número de perfilhos (NP), número de folhas (NF), comprimento das folhas (CF), largura das folhas (LF) e área foliar (AF). Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t ($p \leq 0,05$; $n=3$).

Eventos	AP (cm)		DC (mm)		NN		NP		NF		CF (cm)		LF (cm)		AF (cm ²)	
WT	138,4	± 17	17,408	± 1	8,4	± 1,1402	2	± 2,12	9,4	± 0,8944	111,2	± 14,67	3,1	± 0,26	2167,56	± 357,41
1	153,4	± 12,2	20,352 *	± 1	9	± 1	2,2	± 0,45	8,8	± 0,4472	140 *	± 19,33	2,925	± 0,23	2412,6	± 545,06
7	139,8	± 15,4	17,632	± 1	9,8	± 2,49	5,8 *	± 1,64	8,8	± 0,4472	124,2	± 8,044	2,92	± 0,36	2120,28	± 301,1
13	127,2	± 6,53	16,322	± 1	8	± 0,7071	2,8	± 0,45	9	± 0	123	± 6,285	2,98	± 0,65	2199,84	± 505,77
24	143,8	± 17,3	17,368	± 2	11 *	± 0,7071	2,4	± 1,52	9,4 *	± 0,5477	113,2	± 4,438	2,98	± 0,27	2130,48	± 303,82
25	140,8	± 13,5	18,386	± 2	7,8	± 0,8367	2,8	± 0,45	8,8	± 0,4472	131,2	± 17,22	2,92	± 0,77	2180,76	± 373,93

Tabela suplementar 4: Parâmetros biométricos das plantas S1 com 6 meses. Altura das plantas (AP), diâmetro do colmo (DC), número de nós (NN), número de perfilhos (NP), número de folhas (NF), comprimento das folhas (CF), largura das folhas (LF) e área foliar (AF). Os resultados marcados com asterisco indicam a diferença estatística pelo teste t ($p \leq 0,05$; $n=3$).

Eventos	AP (cm)		DC (mm)		NN		NP		NF		CF (cm)		LF (cm)		AF (cm ²)	
WT	184,3	± 18,0	17,7	± 1,9	16,5	± 4,0	9,0	± 2,6	8,25	± 0,5	93,0	± 12,6	2,60	± 0,18	1879,9	± 460,1
1	152,3 *	± 11,2	17,0	± 0,9	19,5	± 3,1	6,3	± 1,2	8,50	± 0,6	117,0	± 11,9	2,58	± 0,22	2394,3	± 512,6
7	188,0	± 10,1	15,1	± 0,7	18,3	± 6,9	9,7	± 1,5	9,75	± 1,3	88,0	± 7,7	2,25	± 0,38	1767,6	± 518,3
13	180,0	± 2,0	14,8	± 2,1	18,0	± 3,7	7,0	± 1,0	8,50	± 0,6	108,0	± 9,1	2,45	± 0,10	2078,5	± 145,7
24	196,0	± 12,8	16,9	± 3,4	20,5	± 3,0	8,0	± 1,0	9,25	± 1,9	88,8	± 11,4	2,03 *	± 0,13	1494,0	± 121,9
25	178,0	± 11,5	15,6	± 1,9	21,3	± 2,2	8,3	± 0,6	9,50	± 1,3	127,6	± 41,8	2,60	± 0,29	2902,8	± 1228,6

>ScACS1 (JF274985)

ATGGCCGGTGGTAGCAGTCCCGAGCATCATCTCCTCTCCAGGATCGCCGCCGGCGATGGCCACGGCGAGA
 ACTCGTCTACTTCGACGGGTGGAAGGCCCTACGAAATGAACCGCTTCGACCTGCGGCACAACCGCGACGG
CATCATCCAGATGGGCCTCGCCGAGAACCAACTGTCGCTTGACCTGATCGAGCAATGGATCATGGAGCAC
CCGGAGGCGTCCATCTGCACGGCGCAGGGCGCGTCGGAATCCGGAGGATAGCCAACTACCAGGACTACA
ACGGCTGCGCGAGTTCGAGAGGCGATGGCCAAGTTCATGGGGCAGGTGAGGGCGGGAAGGTGACGTT
GACCCCGACCGCGTCTGATGAGCGGAGGAGCCACCGGCGCGCAGGACACTCTGGCCTTCTGCCTCGCT
GACCCAGGCGACGCTACCTCGTGTCCGACGCCATACTACCCAGCTTTCGACCGTACTGTTGCTGGAGGT
CAGGCGTGAAGTGTGCCCATCGAATGCCACAGCGCAAACAATTCACCTTCACACAGGAGGCCTCGT
 GTCGGCATAACGACGACGCGCGGAGACAGGGCATCCGCGTGAAGGGCATCCTCGTACCAACCCCTCCAAC
 CCGTGGGCACCATCATGACCACGCGCCACGCTGGCGATGCTGGCCACGTTGCCACGGAGCACCGTGTCC
 ACCTCATCTGCGACGAGATCTACGCGGGCTCCGCTTTCGCCAAGCCGGACTTCGTGAGCATCGCCGAGGT
 CATCGAGCGCGACGTCCCGGGTGCACAGGGACCTCATCCACATCGCGTACAGCCTTCCAAGGACTTC
 GGCTCCCGGGCTTCCGCGTCGGCATCGTCTACTCGTACAACGACGACGTCGTGGCNTGCGCGCAAGA
 TGTCCAGCTTCGGCCTCGTCTCGTCGACGACGAGAACTTCCGGGCAAGATGCTCTCCGACGCGGAGTT
 CATGGCGCGCTTCTCGCGGAGAGCGCGCGGGCTGGCGCGCGCCACGACCGCTTCATCGCGGGCTC
 CGCAGGTCGGCATCGCGTCTGCCAGGCAACCGGGCTTCTTCGTGGATGGACTGCGGGGCATGC
 TCCGGGACAAGACGACGACGCGGAGCTGGAGCTGTGGCGGGTCATCATAACAAGTCAAGTCAACGT
 GTCGCCCGGACGTCGTTCCATGCAACGAGCTGGCTGGTTCGCGCTGCGCACGCCAACATGGACGAC
 GAGACCATGGAGTGGCGTCCGACCGATCCGCTGCTTCTGCGCCAGCACAGCAGAGCAAGGCCAAGG
 CCGAGCGCTGGGAGCCACGCGGCCCTGCGCCTCAGCTTGCCTGCTCGGGAGGCGCCACCCCTTCGCA
 CCTCGCCATCCCGAGCCCTTGGCGTTGCTGTGCCACAGTCGCCGATGGTCCACGCCAGCTAG

>ScACS2 (JF274986)

ATGGGTGGCAAGTTGTTGCTGGGCGGAGCCAGAGCCACGCGCGGGCGTGGCCCCGCTGTCAAAGG
 TAGCCACGTCGGCCTCCACGCGAGGACTCCCCCTACTTCGCGGGGTGGAAGCCTACGACGAGAACCC
 CTACGACGCGCCTCCAACCCGGGCGCGTCATACAGATGGGCTCGCCGAGAACCAGGTGTCCTTCGAC
 CTCCTCGAGGGGTACTCAGGACACACCCGAGGCCGCGGGCTGGGGCGGTGCCCGGGCTCCGGCGTTG
 CCAGCTTCAGGGACAACGCGCTGTTCCAGGACTACCACGGCTCAAGGCTTCAGGAAGCGATGGCGAG
 CTTTCATGGAGAAGATTAGGGGCGGCAAGGCGAGGTTGACCCCGACCGCATCGTCTCACCGCGCGCG
 ACGGCGGCTAACGAGTGTACGTTTCCTGCGCAACCCCGGAGACGCGTGTGATCCCTACTCCTT
 ACTACCTGGTTTTGACAGAGACCTGAGGTGGAGGACGGGGTGAACATCGTGCCGGTGCACCTGCGACG
 CGCCAACGGGTTCCAGGTACGGTTCGCGCGCTCCAGGCGCGTACGAGGAGCCGAGGCGCGGGGATG
 CGCGTCCGCGCGCTCTGCTACCAACCCGTCACACCCGCTCGGCACCACCGTGAAGAGGTGCGTCTCG
 AGGACGTGCTCGACTTCGTGGTCCGCCACAACATCCACCTCATCTCCGACGAGATCTACTCCGGTCCGT
 CTTCCGCGCGCGGACCTGGTCAGCGTGGCGGAGCTCGTCGAGTCCCGCGCGCGCGCGGCGACGACGCC
 GGCGTCGCGGAACGCGTCCACATCGTGTACAGCTGTCCAAGGACTGGGCTCCCGGGTTCCGCGTCTG

>ScACS3

ATGGTGAGCATGATCGCCGACGAGAAGCCGAGCCGACGCTGTGCCAAGAAGCCGCTGCAACAGCCA
 CGGGACGGACTCGTCTACTTCTGGGTGGGAGGAGTACGAGAAGAACCATACGACCCCGTGGCCAACC
 CCGGCGGATCATCCAGATGGGCCTCGCCGAGAACCAGCTATCCTTCGACCTGTGGAGGCGTGGTGGAG
 GCCAACCCCGGACGCGCTCGGCCTCCGCGGGGGAGGCGCCTCCGCTCTCCGCGAGCTCGCGCTCTCCAGGA
 CTACCACGGCATGCCGGCTTCAAGAATGCATTGGCGAGGTTTCATGTCAGAGCAACCTGGGTACAGGGTGA
 CCTTCGACCCAGCAACATCGTGTCTACCGCCGGCGCCACTCGGCCAACGAGGCGCTCATGTTCTGCCTC
 GCCGACCACGGAGACGCTTTCTCATCCCCACGCCATACTACCCAGGTTTCGACCGTACCTCAAGTGGCG
 CACCGCGCGGAGATCGTCCCGTGCATGCACAAGCGGCAACGGCTTCCGGGTGACGCGCGCGCGCTGG
 ACGACGCGTACC CGCGCGCCAGAAGCAGCGGCTGCGCGTCAAGGGCGTGCATCACCAACCCCTCCAAC
 CCGCTGGGCACACGTCGCCGCGCGCCACCTGGAGATGCTGGTTCGACTTCTGTCGCCCAAGGGCATCCA
 CCTGGTGAGCGACGAGATATACTCCGGCACGGCCTTCGCGGAGCCGGCTTCGTGAGCGTCTCGAGGTGG
 TGGCCGCGGTGTGAACCGCCACGGACGCGCTGGGCTGTGTGCGAGCGCTGCACGTTGGTGTACAGC
 CTGTCCAAGGACCTGGGCTCCCTGGTTTCCGCGTGGGCGCCATCTACTCTCCAACCGCGCGTCTGCTC
 CGCGCCACCAAGATGTCGAGTTCGGCTGGTGTCTCCAGACGACGACCTCTGGCGTCTGCTGTG
 GCGACAGGACTTACCCCGCGTACGTGCGCGAACAACGCGCGGATCAAGGCGCGCGGACCGAGCTG
 GCGGAGGCGTGGCGGATCGCGGATCGAGTGCCTGGAGAGCAACGCGGGCTTCTGCTGGGTCAA
 CATGCGGGGCTGATGCGGACCCATCGTTCGAGGGCGAGATGGAGTATGGAAGAAGGTGGTGTTCGAGG
 TCGGGCTCAACGCTCCTCCCGGGTCTCTGCCACTGCCGAGCCCGGGTGGTTCGCGTCTGCTTCCGC
 AACATGTCCGCCAAGACGCTTACGCTCGCGTCCAGCGCCTGGCCGCTTCGCGGAGGCCACCGTCCCGT
 CGAGGGCCGGGCCCCCGCGCGCGCGTGTCCGGCCCGCAGGAGCATGAGCTCCCGATCGGGTCTCA
 GCTGGGCCAACCGCTCACCCGGCTCCGCGCGGACCGGAAGGCGGAGCGGTAG

Figura suplementar 1: Sequências das *ScACS*s usadas no estudo. As regiões em sublinhadas foram sugeridas pelo *software* Galaxy (Mareuil, Doppelt-azeroual e Ménager, 2017) usadas como alvo pelo RNAi que construímos.

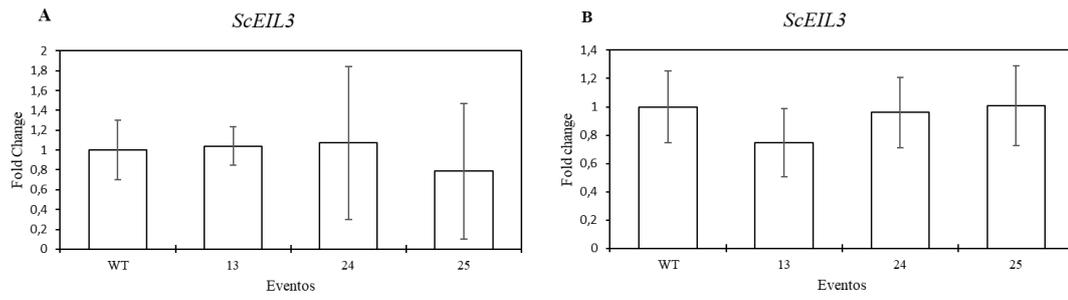


Figura suplementar 2: Expressão gênica do FT *ScEIL3* em folha (A) e colmo (B) nas plantas S1 com 3 e 6 meses respectivamente. (n = 3).

6 ANEXOS

- 6.1 Declaração que a tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, a serem submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada "**Avaliação de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) com baixa produção de etileno**", não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 01 de abril de 2021.



Autor: Daniel Moreira Neris
RG: 585851852



Orientador: Marcelo Menossi Teixeira
RG: 42310263

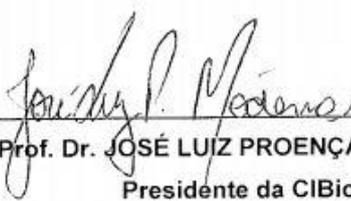
6.2 Termo de aprovação de pesquisa pela comissão de Bioética e/ou Biossegurança.



INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto **CIBio/IB No. 2007/03 - Genômica funcional de plantas**, cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira, sub-projeto "Evaluation of sugarcane plants (*Saccharum ssp*) with low production of ethylene", do pós-graduando Daniel Moreira Neris, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
09 de maio de 2019.



Prof. Dr. JOSÉ LUIZ PROENÇA MÓDENA
Presidente da CIBio
Instituto de Biologia - UNICAMP